

# Entwicklung und Charakterisierung einer photoschaltbaren Histondeacetylase- ähnlichen Amidohydrolase

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von


Dipl.-Ing. (FH) Michael Korbus

aus Heppenheim

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes
Tag der Einreichung:	09. Februar 2015
Tag der mündlichen Prüfung:	24. März 2015

Darmstadt 2015

D17



---

*„Wahre Wissenschaft lehrt vor allem, zu zweifeln und unwissend zu sein“*

Miguel de Unamuno (1864 - 1936)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Photoschaltbare Verbindungen	2
1.2. Azobenzol	5
1.2.1. Photoisomerisierung von Azobenzol	5
1.2.2. Isomerisierungsmechanismen von Azobenzol	7
1.3. Azobenzolderivate als Photoschalter für biologische Applikationen	9
1.3.1. Modifikation von Aminosäurereste durch Azobenzolderivate	10
1.3.2. Monofunktionale Azobenzolderivate	12
1.3.3. Bifunktionale Azobenzolderivate	15
1.3.4. Inkorporation einer photoschaltbaren Aminosäure	17
1.4. Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase	18
1.5. HDAH als photoschaltbarer Biokatalysator	21
1.6. Zielsetzung der Arbeit	24
<b>2. Material</b>	<b>25</b>
2.1. Chemikalien	25
2.2. Puffer und Lösungen	27
2.3. Enzyme und Proteine	30
2.4. DNA und Proteingrößenstandards	30
2.5. Bakterienstämme ( <i>Escherichia coli</i> )	30
2.6. Kits	30
2.7. Verbrauchsmaterialien	31
2.8. FB188 HDAH-Gen und verwendete Vektoren	31
2.9. Geräte	32
2.10. Computerprogramme	34
2.11. Oligonukleotide	35
<b>3. Methoden</b>	<b>39</b>
3.1. Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1. DNA-Konzentrationsbestimmung	39

3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.1.3. DNA-Sequenzierung	39
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	40
3.1.4.1. Analytische Agarose-Gelelektrophorese	40
3.1.4.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese	41
3.1.5. Polymerase-Kettenreaktion	41
3.1.5.1. Ortsspezifische Mutagenese	42
3.1.5.2. PCR-vermitteltes Anfügen von Restriktionsschnittstellen	43
3.1.5.3. Kolonie-PCR	44
3.1.6. Reinigung von DNA-Amplifikaten	44
3.1.7. Restriktion von DNA	44
3.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.1.9. Gelextraktion von DNA-Fragmenten	45
3.1.10. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	45
3.1.10.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.1.10.2. Hitzeschock-Transformation	46
3.2. Biochemische Methoden	47
3.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	47
3.2.2. Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen	47
3.2.3. Rekombinante Proteinexpression von HDAH-Varianten in <i>E. coli</i>	47
3.2.4. Isolierung rekombinant exprimierter HDAH-Varianten aus <i>E. coli</i>	48
3.2.4.1. Zellaufschluss	48
3.2.4.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation	48
3.2.4.3. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie	49
3.2.5. Ultrafiltration von HDAH-Lösungen	50
3.2.6. Protein-Konzentrationsbestimmung	50
3.2.7. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
3.2.7.1. Herstellung diskontinuierlicher SDS-PA-Gele	52
3.2.7.2. Coomassieblau-Färbung von Proteinen	52
3.2.8. UV-A und Blaulichtbestrahlung	52
3.2.8.1. Handlampen	53
3.2.8.2. Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe	53



3.2.9. Spektrale Strahldichtemessung von den verwendeten UV-A und Blaulichtlampen	53
3.2.10. 4-PAM-Modifikation von HDAH-Cystein-Varianten	54
3.2.11. PEG-M-Modifikation von HDAH-Cysteinen	55
3.2.12. Dialyse von HDAH-Proben	55
3.2.13. HDAH-Aktivitätstest	56
3.2.13.1. Generelle Durchführung	57
3.2.13.2. Michaelis-Menten Kinetiken	57
3.2.13.3. Berechnung der Photoschaltungseffizienz	58
3.2.13.4. IC <sub>50</sub> -Bestimmung	59
3.2.14. CD-Spektroskopie	60
3.2.15. UV/Vis-Spektroskopie	61
3.2.15.1. Generelle Durchführung	61
3.2.15.2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von trans-4-PAM	61
3.2.15.3. Bestimmung von DOL-Werten	61
3.2.15.4. Messung von thermischen cis-zu-trans Relaxationskinetiken von 4-PAM und 4-PAM/HDAH-Konjugaten	62
3.2.16. Molekulardynamik-Simulationen	63
3.2.17. Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)	65
3.2.18. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	66
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>67</b>
4.1. Photoisomerisierung von 4-PAM in DMSO	67
4.2. Quantifizierung photostationärer Zustände von 4-PAM	68
4.3. Identifizierung und Eliminierung oberflächenzugänglicher HDAH-Cysteine	70
4.3.1. Vorhersage von oberflächenexponierten HDAH-Cysteinen	70
4.3.2. Quantifizierung 4-PAM modifizierbarer HDAH-Cysteine	71
4.3.2.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von trans-4-PAM	72
4.3.2.2. 4-PAM-Modifikation von HDAH-Cysteinen	72
4.3.3. Identifizierung des 4-PAM-modifizierten HDAH-Cysteins	74
4.3.4. Verifizierung des 4-PAM modifizierten HDAH-Cysteins	77
4.4. Screening nach photoschaltbaren HDAH-Varianten	78
4.4.1. Generierung von Cystein-HDAH-Varianten	78
4.4.2. DOL-Wertbestimmung von 4-PAM modifizierten HDAH-Varianten	80

4.4.3. Photoisomerisierung von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten	81
4.4.4. Identifizierung von photoschaltbaren HDAH-Varianten	84
4.4.5. Steigerung der Photoschaltungseffizienz durch längere Bestrahlungszeit	86
4.4.6. Multiple Photoisomerisierung von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten	88
4.4.7. Reversible Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-M30C Aktivität	90
4.5. Untersuchung des zugrunde liegenden Photoschaltungsmechanismus	92
4.5.1. Thermische cis-zu-trans Relaxation von 4-PAM und 4-PAM/HDAH-Konjugaten	92
4.5.2. MD-Simulationen	95
4.5.3. Einflussnahme der cis/trans-Photoisomerisierung von 4-PAM auf Sekundärstrukturelemente von 4-PAM/HDAH-Konjugaten	99
4.5.4. Untersuchung der cis-4-PAM-Konfigurationsstabilisierung sowie den Photoschaltungsmechanismus	100
4.5.4.1. Selektion von potentiell interagierenden Aminosäuren	101
4.5.4.2. Charakterisierung des Photoschaltungsmechanismus in Abhängigkeit definierter Aminosäuresubstitutionen	103
4.5.4.3. Einflussnahme der Aminosäuresubstitution auf das thermische cis-zu-trans Relaxationsverhalten des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats	107
4.6. Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität durch Azobenzolalkyl-Maleimid-Derivate	111
4.6.1. AMD-Modifikation von HDAH-M30C	111
4.6.2. Charakterisierung der AMD-Photoschaltung	112
4.6.3. Inhibitorische Wirkung von 4-PAM und AMDs	114
<b>5. Diskussion</b>	<b>116</b>
5.1. Identifizierung und Eliminierung oberflächenzugänglicher HDAH-Cysteine	116
5.2. Generierung von Cystein-HDAH-Varianten	117
5.3. Photoschaltung der HDAH-Aktivität durch 4-PAM	117
5.4. 4-PAM Photoschaltungsmechanismen	119
5.5. Photoschaltungsmechanismus des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats	120
5.5.1. Abhängigkeit von definierten Aminosäuresubstitutionen	120
5.6. Stabilisierung der cis-4-PAM-Konfiguration an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche	122
5.6.1. Zusammenfassung	127
5.7. Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität durch AMDs	129
5.8. Auswirkung des photostationären Zustands auf die Photoschaltungseffizienz	130
5.9. $V_{\max}$ als geeigneter Parameter zur Bestimmung der Photoschaltungseffizienz	132

<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>134</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>146</b>
Abb. A. 1: Applizierte UV-A und Blaulicht Bestrahlungsdosen	146
Abb. A. 2: AMC-Kalibriergerade	147
Abb. A. 3: Isosbestischer Punkt von 4-PAM	147
Abb. A. 4: RMSD-Werte von 4-PAM/HDAH-S20C und M30C	148
Abb. A. 5: VMD spezifische Annotation der C-Atome von 4-PAM und von den wichtigsten Aminosäuren	149
Tab. A. 1: Prognostizierte Peptidfragmente von HDAH-Wt nach tryptischen Verdau	150
Abb. A. 6: Protonenannotation der 4-PAM-Isomere	151
Tab. A. 2: Zuordnung und chemische Verschiebung von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -4-PAM in DMSO-d <sub>6</sub>	151
Abb. A. 7: IMAC-Chromatogramm von HDAH-Variante H35S an immobilisierten Zn <sup>2+</sup> -Ionen	152
Abb. A. 8: LC-ESI-MS Analyse von Trypsin-hydrolysierten HDAH-Wt-Konjugat	153
Abb. A. 9: SDS-PAGE verschiedener exprimierter Cystein-HDAH-Varianten	154
Abb. A. 10: Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten	155
Tab. A. 3: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 Å) zwischen <i>cis</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-M30C	156
Tab. A. 4: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 und 3.8 Å) zwischen <i>cis</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C	157
Tab. A. 5: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (3.8 Å) zwischen <i>trans</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C	158
Abb. A. 11: Dosis-Wirkungskurven von 4-PAM und AMDs	160
Abb. A. 12: Dosis-Wirkungskurve von SAHA	161
Tab. A. 6: V <sub>max</sub> und K <sub>m</sub> -Werte unmodifizierter und AMD-modifizierter HDAH-M30C	161
Abb. A. 13: UV/Vis-Spektren der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Konfiguration von AMD/HDAH-M30C-Konjugaten	162
Abb. A. 14: Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM und AMD 1a-b/HDAH-M30C-Konjugaten	163
Abb. A. 15: 600 MHz <sup>1</sup> H-NMR-Spektren von 4-PAM in DMSO-d <sub>6</sub>	164
Abb. A. 16: Potentiell involviertes Histidin in der Stabilisierung von <i>cis</i> -4-PAM an der HDAH-Wt-Oberfläche	165
Abb. A. 17: HC-ähnliche Struktur zur potentiellen Stabilisierung von <i>cis</i> -4-PAM an der HDAH-M30C-Oberfläche	165

---

<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>166</b>
<b>10. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>171</b>
<b>11. Tabellenverzeichnis</b>	<b>174</b>
<b>12. Publikationen</b>	<b>176</b>
<b>13. Danksagung</b>	<b>177</b>
<b>14. Erklärungen</b>	<b>178</b>
<b>15. Lebenslauf</b>	<b>180</b>

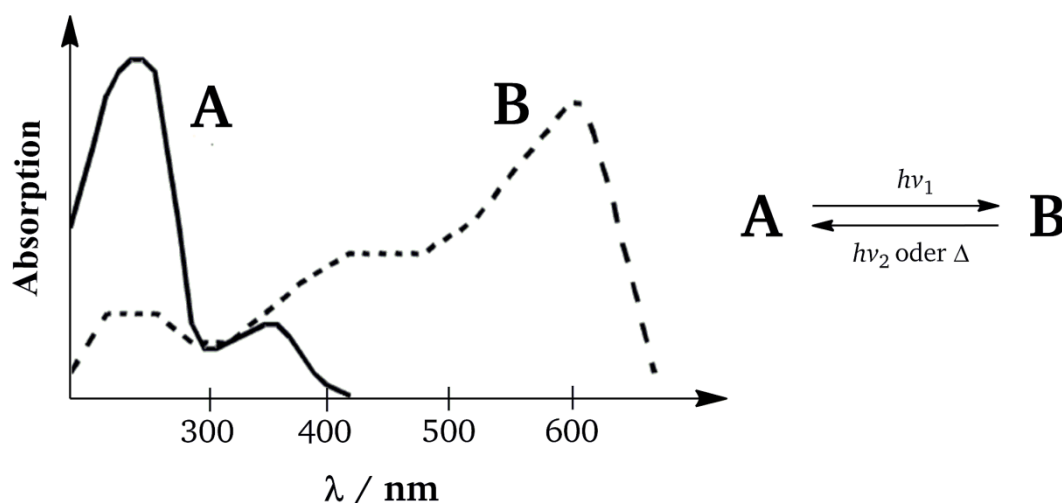
## 1. Einleitung

In der Natur existieren faszinierende Modelle, bei denen Lichtstimuli zur Kontrolle biologischer Funktionen effizient eingesetzt werden. Prominente Beispiele in diesem Zusammenhang sind die in Pflanzen stattfindende Photosynthese<sup>1,2</sup>, eine bakterielle Protonen-Pumpe<sup>3</sup> und der Sehprozess<sup>4</sup>. Die visuelle Signaltransduktion (Sehprozess) in Vertebraten wird beispielsweise durch eine lichtinduzierte Konformationsänderung des Photorezeptorproteins „Rhodopsin“ ermöglicht, welches aus Opsin, einem heptahelicalen Transmembranprotein und dem lichtsensitiven Chromophor - „Retinal“, aufgebaut ist. Die chemische Modifikation der Opsine durch Retinal erfolgt durch Ausbildung einer Schiffschen Base zwischen Retinal und einer bestimmten  $\epsilon$ -Aminogruppe von einem Lysinrest der Opsin-Proteine.<sup>5,4</sup> Die Ursache für die Konformationsänderung von Rhodopsin ist die photoinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung von Retinal, wobei 11-*cis*-Retinal zu einer Inaktivierung und all-*trans*-Retinal zu einer Aktivierung des Photorezeptors führt.<sup>4,6</sup> In *Halobacterium Halobium* beispielweise agiert Bakteriorhodopsin als lichtgesteuerte Protonen-Pumpe, die als Lichtenergiekonverter zur Erzeugung chemischer Energie in Form eines Protonen-Konzentrationsgradienten genutzt wird.<sup>3</sup> Hierbei reguliert das an Bakteriorhodopsin kovalent gekoppelte Retinal die Aktivierung (13-*cis*-Retinal) und Inaktivierung (all-*trans*-Retinal) der Protonen-Pumpe, verursacht durch photoinduzierte Konformationsänderung von Bakteriorhodopsin.<sup>7,8</sup> Solche Systeme wie z.B. der lichtgesteuerte Ionenkanal „Channelrhodopsin-2“ findet im Bereich der Optogenetik große Aufmerksamkeit, der als Werkzeug für die örtliche als auch zeitliche Kontrolle neurobiologischer Applikationen eingesetzt werden kann.<sup>9</sup>

Das aus der Natur abgeleitete Prozedere für die Entwicklung lichtsensitiver Biomoleküle, bei dem bspw. Proteine durch eine lichtschoaltbare Verbindung modifiziert werden,<sup>3,4</sup> um deren Funktionen durch einen externen Lichtstimulus kontrollieren zu können, ist ein beständiges und attraktives Forschungsfeld in den letzten Jahrzehnten<sup>10-14</sup> sowie Inspiration aktuellster Forschung.<sup>15-18</sup> Durch die Generierung von artifiziell, photoschoaltbaren Biomolekülen können im Detail biologische Vorgänge in lebenden Organismen untersucht,<sup>19,20</sup> neuartige Testsysteme für biomedizinische oder biotechnologische Applikationen entwickelt<sup>21-23</sup> und Biokatalysereaktionen systematisch „an und aus“ geschoaltet werden.<sup>14</sup> Potentielle Verbindungen, die für die Entwicklung photoschoaltbarer Biomoleküle eingesetzt werden können, sind in dem nachfolgenden Kapitel beschrieben.

## 1.1. Photoschaltbare Verbindungen

Unter photoschaltbaren- bzw. photochromatischen Verbindungen werden Chromophore definiert, die durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge ( $\lambda$ ) reversibel in zwei stabile isomere Formen (A und B) überführt werden können (Abb. 1) und diese unterschiedliche Absorptionsspektren aufweisen.<sup>24,25,26</sup> Diese Eigenschaft wird unter „Photochromie“ zusammengefasst, die im einfachsten Sinne auch als lichtinduzierte, reversible Farbänderung definiert ist.<sup>26</sup> Solche Verbindungen werden unter anderem auch als „Photoschalter“<sup>27</sup> bezeichnet.



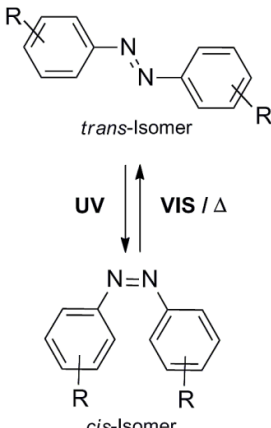
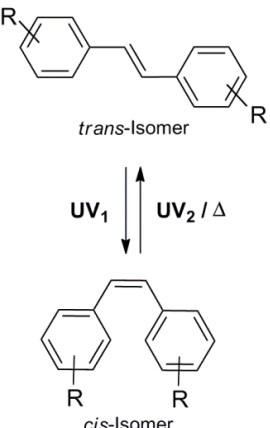
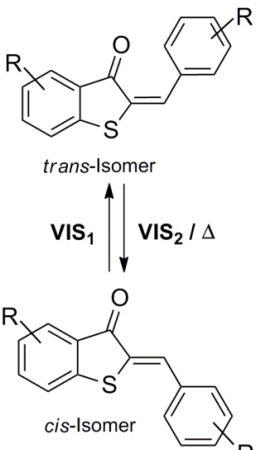
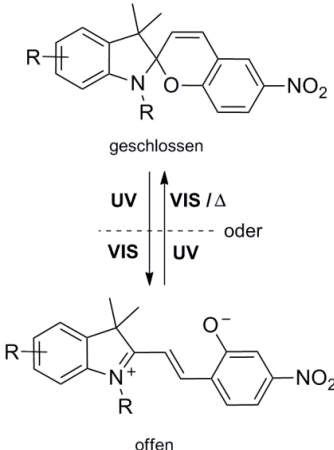
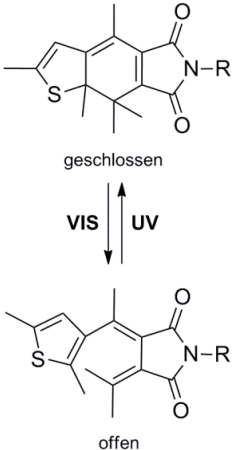
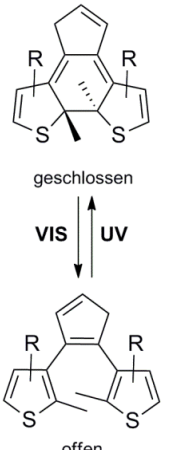
**Abb. 1: Verallgemeinerte Darstellung der Photochromie.** Die unterschiedlichen Formen (A und B) einer photochromatischen Verbindung können durch Lichtbestrahlung entsprechender Energie ( $E=h\nu$ ) reversibel ineinander überführt werden. Während Form B (gefärbt, z.B. blau oder rot) nur photochemisch generiert werden kann ( $h\nu_1$ ), kann die Rückreaktion in die thermostabile Form A (farblos oder blassgelb) neben Lichtbestrahlung ( $h\nu_2$ ) zusätzlich thermisch ( $\Delta$ ) erfolgen. Modifiziert nach Bouas-Laurent & Dürr.<sup>26</sup>

Der Prozess des lichtinduzierten Transfers zwischen den einnehmbaren stabilen isomeren Formen A und B entspricht bei den meisten organisch photochromatischen Systemen einer unimolekularen Reaktion, die oftmals einhergeht mit einer reversiblen Färbung (Form A) und Entfärbung (Form B) (Abb. 1) der jeweiligen Verbindung. Hierbei stehen vor allem die *cis-trans* bzw. *trans-cis* Isomerisierung sowie die elektrocyclische Reaktion (bimolekulare Reaktion) in Ring-offene und Ring-geschlossene Systeme im Vordergrund.<sup>24,26</sup> Bekannte photochromatische Systeme sind Azobenzol<sup>28</sup>, Spiropyran<sup>29</sup>, Stilben<sup>30</sup>, Diarylethen<sup>31</sup>, Fulgide<sup>32</sup> oder Hemithioindigo<sup>33</sup> Verbindungen, welche durch Bestrahlung mit ultravioletem (UV) oder visuellem (VIS) Licht in die jeweiligen *cis*- (*Z*) und *trans* (*E*)-Isomere (Azobenzol, Stilben und Hemithioindigo) sowie über eine elektrocyclische Reaktion in Ring-offene bzw. geschlossene isomere Formen (Spiropyran, Diarylethen und Fulgide) konvertiert werden können<sup>25,28</sup> (Tab. 1). Die reversible Überführung in die jeweils entsprechenden stabilen Isomerformen

führt hierbei nicht nur zu einer Geometrieänderung, welche insbesondere bei Azobenzolen sowie Hemithioindigos und geringer bei Diarylethen Verbindungen ausgeprägt ist, sondern unter anderem auch zu einer Veränderung des Dipolmoments ( $\Delta\mu$ ) und der Ladungsverteilung.<sup>25</sup> Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften sind Derivate von den genannten photoschaltbaren Verbindungen (Tab. 1) gut geeignet, um verschiedenste Biomoleküle sowie deren Funktion durch einen externen Lichtstimulus reversibel zu kontrollieren.<sup>13,14,34-38</sup> Darüber hinaus werden photochromatische Systeme anhand der thermischen Stabilität der photogenerierten Isomere in zwei Kategorien eingeteilt.<sup>39</sup> Unter dem **P-Typ** (photochemisch reversibel) werden photochromatische Verbindungen klassifiziert, deren Isomere nur durch Lichtbestrahlung reversibel ineinander überführt werden können, eine thermische Rückreaktion in das initiale Isomer bei hohen Temperaturen ist allerdings nicht möglich (z.B. bei Fulgiden oder Diarylethenen). Bei dem **T-Typ** (thermisch reversibel) hingegen, kann das photogenerierte Isomer in die initiale Form thermisch zurücküberführt werden (z.B. bei Azobenzolen, Stilbenen, Hemithioindigos und Spiropyranen).

Im Gegensatz zu anderen potentiell applizierbaren Stimuli wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke oder elektrische- und magnetische Felder,<sup>40</sup> bietet die örtlich hochaufgelöste und zeitliche Kontrolle eines Lichtstimulus mit den heutzutage erhältlichen und leistungsstarken Lichtquellen einen großen Vorteil. Der Lichtstimulus kann in Abhängigkeit der Lichtquellenleistung einfach dosiert und schnell eingebracht werden und bietet damit die Möglichkeit, die Interkonversion zwischen den bestehenden Isomerformen ohne direkten Kontakt mit photochromatischen Materialien/Lösungen aus der Ferne kontrollieren zu können.<sup>39</sup> Für die Durchführung von multiplen, reversiblen Photoisomerisierungsprozessen sollten Photoschalter eine schnelle Photokonvertierung in beide Isomerformen, hohe Quantenausbeuten, große Extinktionskoeffizienten, gut separierte UV/Vis-Spektren bzw. Absorptionsmaxima sowie eine hohe Ermüdungsresistenz und keine nachweisliche Photozerstörung aufweisen. Die durch Lichtbestrahlung induzierte Konvertierung der genannten photochromatischen Systeme (Tab. 1) in die jeweiligen *cis/trans*-Isomere, bzw. die offene und geschlossene Form, geht einher mit der Ausbildung eines photostationären Zustands (PSS), welcher das chemische Gleichgewicht zwischen den entsprechenden Isomerformen beschreibt.<sup>25</sup> Die Gleichgewichtsverschiebung in Richtung des gewünschten Isomers ist abhängig von der eingetragenen Intensität (Energiezufuhr) und Wellenlänge.<sup>41</sup>

Tab. 1: Potentielle photoschaltbare Verbindungen zur Regulierung von Biomolekülfunktionen. R = mögliche Restmodifikation. Modifiziert nach Szymański *et al.*<sup>25</sup>

<i>cis-trans</i> Isomerisierung		
<p><b>Azobenzol</b></p>  <p><i>trans</i>-Isomer</p> <p>UV <math>\rightleftharpoons</math> VIS / <math>\Delta</math></p> <p><i>cis</i>-Isomer</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Mittel (<math>\Delta\mu = \sim 3</math> Debye)</p>	<p><b>Stilben</b></p>  <p><i>trans</i>-Isomer</p> <p>UV<sub>1</sub> <math>\rightleftharpoons</math> UV<sub>2</sub> / <math>\Delta</math></p> <p><i>cis</i>-Isomer</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Gering</p>	<p><b>Hemithioindigo</b></p>  <p><i>trans</i>-Isomer</p> <p>VIS<sub>1</sub> <math>\rightleftharpoons</math> VIS<sub>2</sub> / <math>\Delta</math></p> <p><i>cis</i>-Isomer</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Mittel (<math>\Delta\mu = \sim 1.6</math> Debye)</p>
Elektrocyclische Ring-Öffnung/Ring-Schluss		
<p><b>Spiropyran / Merocyanin</b></p>  <p>geschlossen</p> <p>UV <math>\rightleftharpoons</math> VIS / <math>\Delta</math> VIS <math>\rightleftharpoons</math> UV oder</p> <p>offen</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Groß (<math>\Delta\mu = 8 - 15</math> Debye)</p>	<p><b>Thiophenfulgid</b></p>  <p>geschlossen</p> <p>VIS <math>\rightleftharpoons</math> UV</p> <p>offen</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Gering</p>	<p><b>Diarylethen</b></p>  <p>geschlossen</p> <p>VIS <math>\rightleftharpoons</math> UV</p> <p>offen</p> <p><b>Polaritätsänderung</b> Gering</p>



---

## 1.2. Azobenzol

---

Bei Azobenzolen handelt es sich um aromatische Verbindungen, bei denen zwei Phenylgruppen über die namensgebende Azogruppe ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) verknüpft sind (Tab. 1). Die Klassifizierung von Azobenzolverbindungen erfolgt in Form von drei Typen, die sich in der Anordnung ihrer elektronisch angeregten Übergänge ( $n-\pi^*$  und  $\pi-\pi^*$ ) differenzieren.<sup>42,43</sup> Die Absorptionsspektren von Molekülen des **Azobenzol Typ** (gelb bis rot), definieren sich durch einen energetisch niedrig gelegenen  $n-\pi^*$ - (visueller Bereich) und einen höher gelegenen  $\pi-\pi^*$ -Übergang (UV Bereich), welche durch eine große Energielücke gut voneinander separiert sind. Bei den Molekülen des **Aminoazobenzol Typ** (orange) sind die Phenylringe mit Aminogruppen in *ortho*- und *para*-Stellung substituiert, welches mit einem großen Einfluss auf die Absorptionseigenschaft einhergeht. In diesem Zusammenhang wird die  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbande bathochrom (zu höheren Wellenlängen und niedrigeren Anregungsenergien) verschoben, welches dazu führt, dass die  $n-\pi^*$  und die  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbanden in nächster Nachbarschaft zu einander bzw. überlappend vorliegen können. Bei dem **Pseudostilben Typ** (rot) handelt es sich um Azobenzolverbindungen, deren 4,4'-Positionen mit einer auxochromen (z.B.  $-\text{NH}_2$ ) sowie einer antiauxochromen (z.B.  $-\text{NO}_2$ ) Gruppe versehen sind. Durch die Kombination der beiden zuvor genannten Gruppen wird die bathochrome Verschiebung der  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbande verstärkt. Hierbei wird die Energie des  $\pi-\pi^*$ -Übergangs verringert, welches die  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbande hinter die  $n-\pi^*$ -Absorptionsbande verschiebt und in einer inversen Anordnung der Absorptionsbanden resultiert. Die  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbande stellt die dominierende Bande dar. Während Lösungsmittel bei Verbindungen des Azobenzol Typs einen eher geringeren Einfluss auf die Absorptionsspektren nehmen, zeigen Verbindungen des Aminoazobenzol und Pseudostilben Typs ein sensitives Verhalten.<sup>43,44</sup>

---

### 1.2.1. Photoisomerisierung von Azobenzol

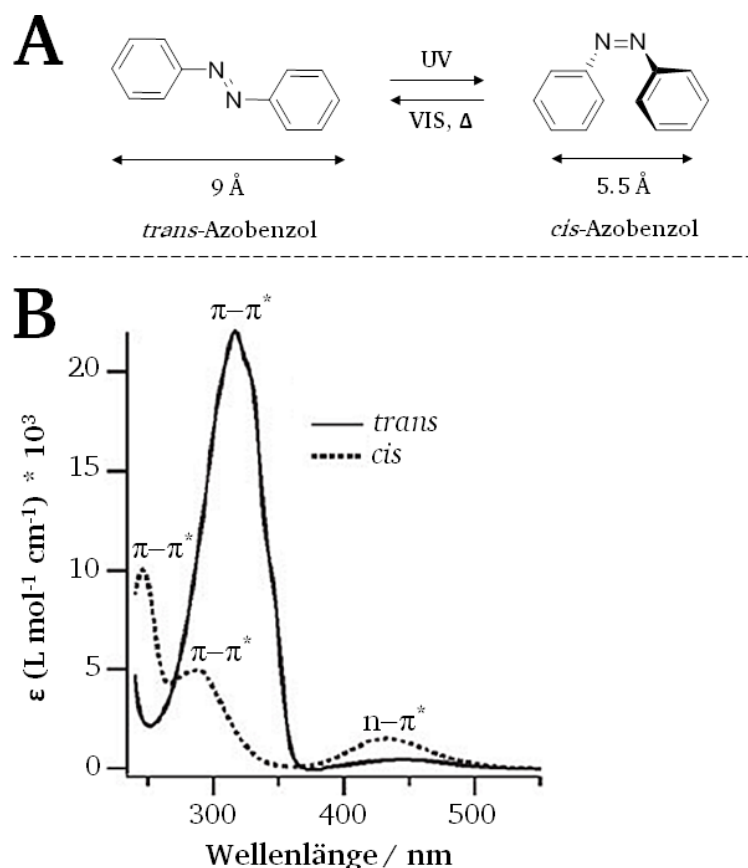
---

Azobenzolverbindungen kommen in zwei geometrischen Isomeren vor, dem *trans*-Isomer (*E*) und dem metastabilen *cis*-Isomer (*Z*), die durch Lichtbestrahlung reversibel ineinander überführt werden können.<sup>43</sup> Die photoinduzierte *cis-trans* bzw. *trans-cis* Isomerisierung wurde bereits im Jahre 1937 von Hartley<sup>45</sup> beobachtet, der das *cis*-Isomer erstmals isolieren und physikalisch näher charakterisieren konnte. Das *trans*-Isomer von Azobenzol stellt im Vergleich zu dem *cis*-Isomer das sowohl energieärmere als auch thermodynamisch stabilere Isomer ( $\sim 12 \text{ kcal mol}^{-1}$ )<sup>42</sup> und gleichzeitig die dominante Form in dunkler Umgebung sowie bei Raumtemperatur dar.<sup>28</sup> Die Photoisomerisierung in die *cis*-Konfiguration erfolgt durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 320 - 380 \text{ nm}$ ), die Umwandlung in

die *trans*-Konfiguration mittels VIS-Licht ( $\lambda = 400 - 450 \text{ nm}$ ).<sup>28</sup> Der durch Lichtbestrahlung induzierte PSS von Azobenzol und dessen Derivaten (*cis/trans*-Verhältnis bzw. Isomeren-Gleichgewicht) ist abhängig von der applizierten Wellenlänge<sup>46,47</sup>, chemischen Substituenten an den Phenylgruppen<sup>48</sup>, der Temperatur<sup>49</sup> und den in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich nachgewiesenen Quantenausbeuten.<sup>50</sup> Darüber hinaus kann das *trans*-Isomer zusätzlich durch thermische Relaxation in dunkler Umgebung generiert werden, welches substituentenabhängig mehrere Millisekunden<sup>51</sup>, Stunden<sup>52</sup> oder Tage<sup>53</sup> dauern kann.

Die lang gestreckte *trans*-Konfiguration von Azobenzol besitzt eine planare Struktur mit  $C_{2h}$  Symmetrie und besitzt keinen Dipolmoment.<sup>54,28,25</sup> Bei der gestauchten *cis*-Konfiguration hingegen, welche aufgrund *ortho*-substituierter Wasserstoffatome und der damit verbundenen sterischen Hinderung keine planare Struktur ausbilden kann, sind die beiden Phenylgruppen parallel zueinander ausgerichtet und diese in Bezug auf die planare Azogruppe um ca.  $56^\circ$  aus der Ebene gedreht.<sup>42</sup> Für die *cis*-Konfiguration wurde ein Dipolmoment von  $\sim 3 \text{ Debye}$  bestimmt.<sup>45,55</sup> Durch die Photokonvertierung der lang gestreckten *trans*-Konfiguration in die gestauchte *cis*-Konfiguration erfolgt neben einer Dipolmomentsteigerung eine Distanzverkürzung zwischen den endständig gelegenen *para*-Kohlenstoffatomen um  $\sim 3.5 \text{ \AA}$ <sup>27,28</sup> (Abb. 2 A).

Generell können die UV/Vis-Spektren von *cis*- und *trans*-Azobenzol gut voneinander separiert werden, welches eine reversible Photoschaltung zwischen den beiden Isomeren ermöglicht<sup>27,56</sup> (Abb. 2 B). Das UV/Vis-Spektrum von unsubstituiertem *trans*-Azobenzol besitzt zwei charakteristische Absorptionsbanden. Eine stark ausgeprägte und intensive Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) bei  $\sim 320 \text{ nm}$ , welche dem  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang (zweiter Singulett-Anregungszustand:  $S_2 \leftarrow S_0$ ) entspricht sowie einer wesentlich schwächeren Absorptionsbande ( $\lambda_{\text{max}} = \sim 440 \text{ nm}$ ), die dem  $n$ - $\pi^*$ -Übergang (erster Singulett-Anregungszustand:  $S_1 \leftarrow S_0$ ) zugeordnet wird. Die *cis*-Konfiguration hingegen besitzt einen intensiven  $n$ - $\pi^*$ -Übergang mit einem Absorptionsmaximum bei  $\sim 440 \text{ nm}$  und zwei hypsochrom verschobene  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbanden ( $\lambda_{\text{max}} = \sim 270 \text{ nm}$  und  $\sim 250 \text{ nm}$ ).<sup>43,44,50</sup> Aufgrund der Tatsache, dass sich die UV/Vis Spektren von *cis*- und *trans*-Azobenzol überschneiden, können keine absoluten PSS (100 %) eines bestimmten Isomers generiert werden (Abb. 2 B). Generell können durch Lichtbestrahlung  $\sim 90 \%$  der *cis*-Konfiguration oder  $\sim 95 \%$  der *trans*-Konfiguration erzielt werden.<sup>12</sup> Durch thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation hingegen können  $> 99 \%$  des *trans*-Isomers regeneriert werden.<sup>57</sup>



**Abb. 2: Reversible Photoisomerisierung von *trans*- und *cis*-Azobenzol.** (A) Photoinduzierte Distanzänderung<sup>28</sup> zwischen den beiden endständig gelegenen *para*-Kohlenstoffatomen der *trans*- und *cis*-Konfiguration (modifiziert nach Bandara & Burdette).<sup>50</sup> (B) UV/Vis-Spektren der *trans*- und *cis*-Isomere von Azobenzol in Ethanol (modifiziert nach Beharry & Woolley).<sup>27</sup>

### 1.2.2. Isomerisierungsmechanismen von Azobenzol

Für die *trans-cis* Photoisomerisierung von Azobenzol werden vier mögliche Mechanismen vorgeschlagen, Rotation, Inversion, gemeinsame Inversion und die Inversion-unterstützte Rotation (Abb. 3). Der Rotationsmechanismus geht einher mit einem Bindungsbruch der N=N  $\pi$ -Bindung, welches eine ungehinderte und freie Rotation um die N-N Bindung ermöglicht. Während der Rotation erfolgt die Änderung des C-N-N-C Diederwinkels, wobei der N-N-C Winkel einseitig bei  $\sim 120^\circ$  fixiert bleibt. Bei dem Inversionsmechanismus erfolgt die Steigerung des einen N=N-C Bindungswinkels auf  $180^\circ$ , während der C-N=N-C Diederwinkel bei  $0^\circ$  beibehalten wird. Die dadurch resultierende Konformation weist einen Übergangszustand mit einem  $sp$ -hybridisierten Azo-Stickstoffatom auf. In Bezug auf den Isomerisierungsmechanismus der gemeinsamen Inversion werden beide N=N-C Bindungswinkel gleichzeitig auf  $180^\circ$  erhöht und infolgedessen ein linearer Übergangszustand erzeugt. Der letzte vorgeschlagene Isomerisierungsmechanismus, die Inversion-unterstützte Rotation, ist das

Produkt einer simultan ablaufenden Änderung des C-N=N-C Diederwinkels (große Änderung) sowie dem N=N-C Bindungswinkel (klein, aber signifikant). Mit Ausnahme des gemeinsamen Inversionsmechanismus weisen die Übergangszustände bei den anderen drei erwähnten Isomerisierungsmechanismen ein Dipolmoment und demnach einen polaren Übergangszustand auf.<sup>50</sup> Die Ausführung des *trans-cis* Isomerisierungsmechanismus wird anregungsabhängig initiiert. Der Inversionsmechanismus wird bei Anregung des  $n\text{-}\pi^*$ -Übergangs ( $S_1 \leftarrow S_0$  Anregung) und der Rotationsmechanismus bei Anregung des  $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergangs ( $S_2 \leftarrow S_0$  Anregung) eingeleitet.<sup>58,59</sup> Für die *cis-trans* Photoisomerisierung von Azobenzol wird ein Rotationsmechanismus<sup>60</sup> und für die thermisch stattfindende *cis-trans* Isomerisierung von Azobenzolderivaten der Rotations<sup>61</sup>- als auch der Inversionsmechanismus<sup>62</sup> angenommen. Darüber hinaus sind die beiden Isomerisierungsmechanismen bei Azobenzolderivaten des Pseudostilben Typs, in Bezug auf die thermische *cis-zu-trans* Relaxation zudem sehr lösungsmittelabhängig - so wird der Inversionsmechanismus insbesondere in apolaren Lösungsmitteln bevorzugt, wohingegen der Rotationsmechanismus in sehr polaren Lösungsmitteln favorisiert durchgeführt wird.<sup>55,63</sup>

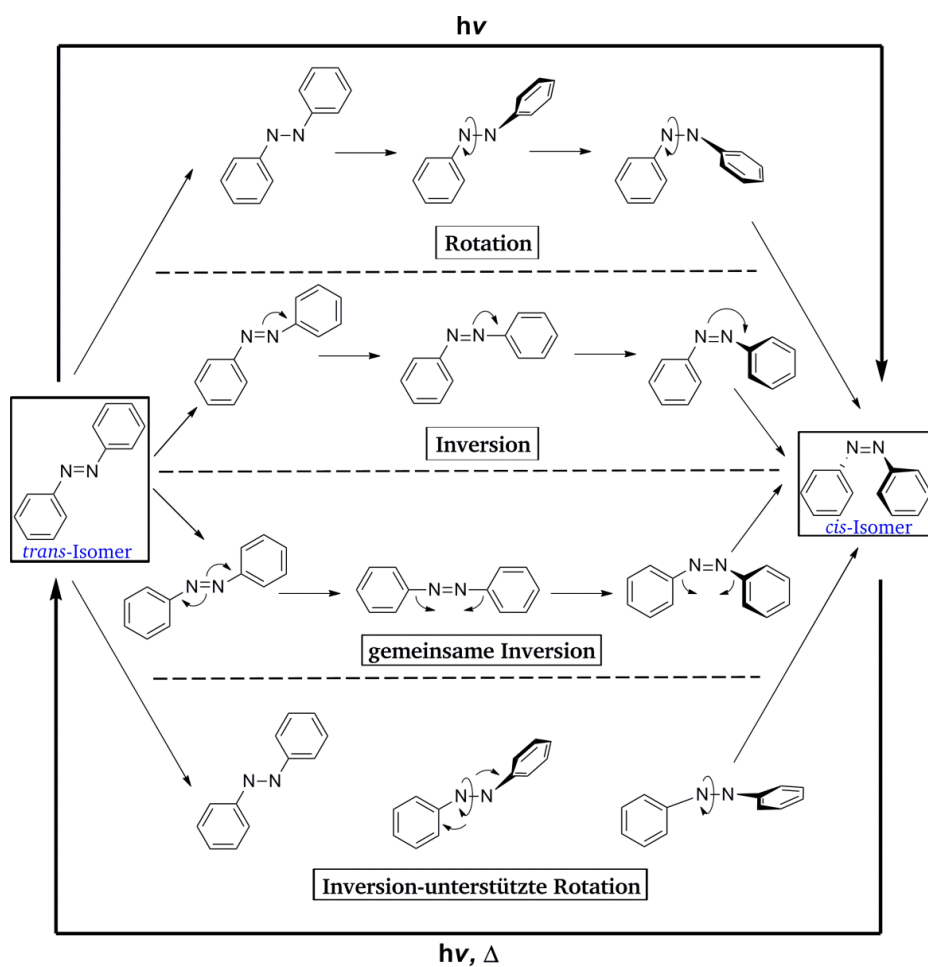


Abb. 3: Angenommene *trans-zu-cis* Photoisomerisierungsmechanismen von Azobenzol. Modifiziert nach Bandara & Burdette.<sup>50</sup>

### 1.3. Azobenzolderivate als Photoschalter für biologische Applikationen

Azobenzole stellen die am besten untersuchten und charakterisierten photoschaltbaren Verbindungen dar.<sup>27</sup> Aufgrund der attraktiven und vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften wie einer sehr schnellen *cis-trans* bzw. *trans-cis* Photoisomerisierung (im Femto- bis Pikosekundenbereich)<sup>56,64,65</sup>, die Durchführung von mehrfach wiederholten und reversiblen Photoisomerisierungszyklen ohne nachweisliche Photozerstörung<sup>16,41</sup> sowie die Generierung relativ hoher PSS<sup>41,46</sup> und Quantenausbeuten<sup>50,66</sup> werden Azobenzolderivate äußerst gerne als Photoschalter für die lichtinduzierte Kontrolle verschiedener Biomoleküle und deren Applikationen eingesetzt. Die Photokontrolle durch Azobenzolderivate wird hauptsächlich durch die Photoisomerisierung hervorgerufene Geometrie- bzw. Distanzänderung zwischen den endständig gelegenen *para*-Kohlenstoffatomen (Abb. 2), herbeigeführt. Speziell die beschriebene, reversibel durchführbare molekulare Bewegung von Azobenzol ermöglicht es bspw., die Konformation von diversen Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren gezielt zu verändern, um darüber bestimmte Funktionen kontrollieren zu können (Abb. 4).

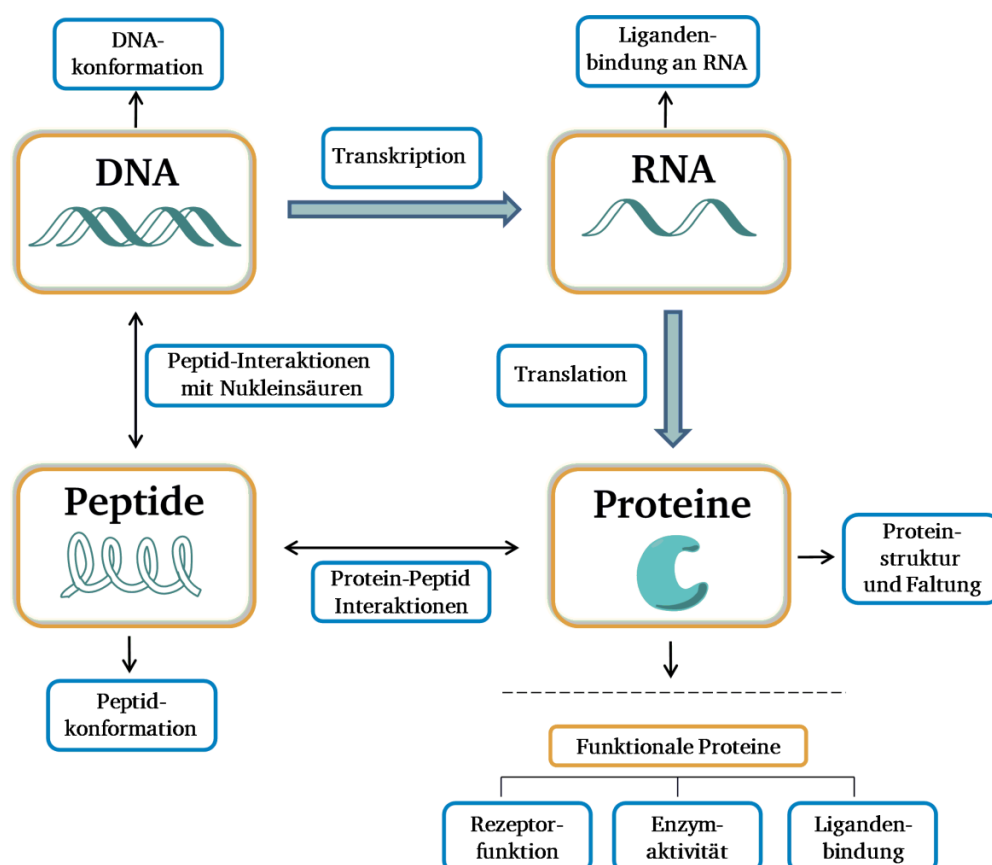


Abb. 4: Übersicht über Biomoleküle (orange umrahmt) und biologische Prozesse (blau umrahmt), welche durch Modifikation mit Azobenzolderivaten photoreguliert werden können. Modifiziert nach Szymański *et al.*<sup>25</sup>

---

### 1.3.1. Modifikation von Aminosäureresten durch Azobenzolderivate

---

Die kovalente Modifikation von Biomolekülen durch Azobenzolderivate kann durch verschiedene funktionelle Gruppen vermittelt werden. Basierend darauf, dass in der vorliegenden Arbeit Proteine modifiziert wurden, wird auf diesen Sachverhalt näher eingegangen und die Photokontrolle von Nukleinsäuren (RNA<sup>67</sup> und DNA<sup>68,69</sup>) vernachlässigt. Das Ziel von Proteinmodifikationen liegt in der selektiven Modifizierung eines bestimmten Aminosäurerests, welcher gleichzeitig in Konkurrenz mit anderen reaktiven Seitenketten innerhalb des Zielproteins steht. Für die Gewährleistung einer effizienten und selektiven Kopplungsreaktion müssen Bedingungen vorherrschen, die eine Proteindenaturierung vermeiden. Diesbezüglich muss die Modifikationsreaktion in wässriger Lösung bei niedrigeren Temperaturen bis Raumtemperatur und in der Nähe bzw. bei neutralem pH-Wert durchführbar sowie tolerant gegenüber Salzen und Tensiden sein.<sup>70,71</sup>

Aminosäurereste, die generell für Modifikationsreaktionen zur Verfügung stehen können, sind Lysin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan.<sup>72</sup> Am häufigsten werden Modifikationsreaktionen gegen die nukleophilen Seitenketten von Lysin und Cystein gerichtet,<sup>73,74</sup> für die eine Vielzahl direkt anwendbarer Modifikationssubstanzen kommerziell erhältlich sind. Lysin-Modifikationen können durch den Einsatz von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) Estern oder Isothiocyanat-Verbindungen vermittelt werden (Abb. 5 A).<sup>72</sup> Das Prozedere einer selektiven Lysin-Modifikation ist im Allgemeinen, aufgrund des meist hohen Vorkommens in Proteinen (10-40 Lysine), auf Proteine mit wenigen oder gar keinen Lysinen anwendbar und infolge dessen häufig als unspezifisches Kopplungsprozedere von Proteinen genutzt.<sup>72,75</sup> Zusätzlich kann pH-bedingt die kovalente Modifikation der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe favorisiert werden.<sup>76,77</sup>

Eine sehr beliebte und weit verbreitete Strategie für die Durchführung von selektiven Proteinmodifikationen ist das gezielte Einführen von Cysteinen durch ortsspezifische Mutagenese und deren Alkylierung. Basierend auf der starken Nukleophilie des Cysteinrests, vermittelt durch die Sulfhydrylgruppe, können Alkylierungsreaktionen durch thiolreaktive Substanzen wie Iodacetamide ( $\alpha$ -Halocarbonyl), Maleimide und Vinylsulfon-Verbindungen (Michael-Akzeptoren) bewerkstelligt werden (Abb. 5 B).<sup>70,78</sup> Bedingt dadurch, dass Cystein zu einer der am seltensten vorkommenden Aminosäuren gehört,<sup>75</sup> ermöglicht dies die Kombination mit ortsspezifischer Mutagenese die Generierung von Proteinkonstrukten mit nur einem einzelnen modifizierbaren Cystein.<sup>70</sup> Alternativ zu Cysteinmodifikationen sind Tryptophan- oder Tyrosinmodifikationen möglich, welche durch die Verwendung von Metall-Carbenoiden<sup>73</sup> oder Diazoniumsalzen<sup>79</sup> durchgeführt werden können.

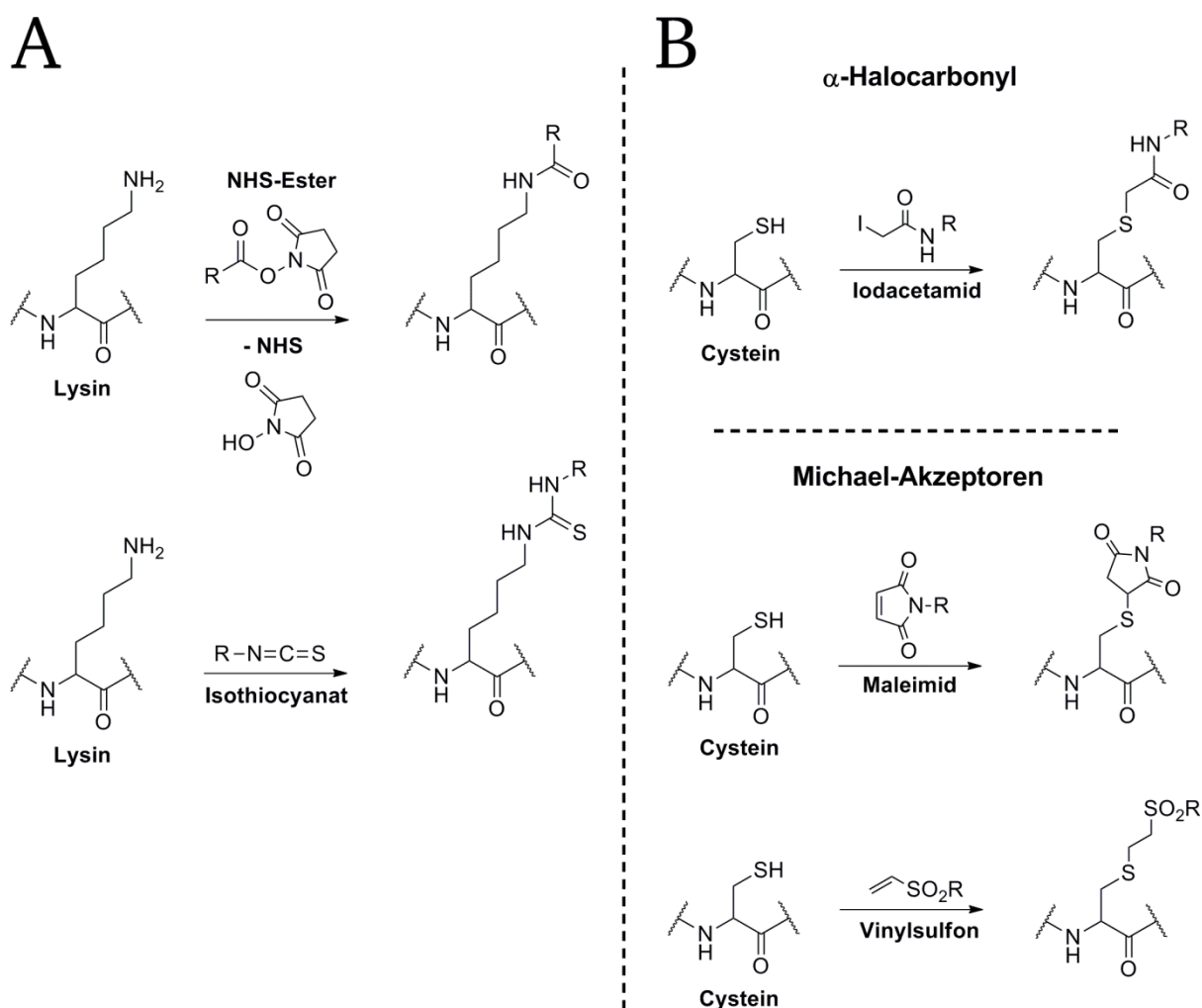


Abb. 5: Proteinmodifikationsreaktionen an Lysin (A) und Cystein (B), vermittelt durch verschiedene Amin- und thiolreaktive Reagenzien. Modifiziert nach Chalker *et al.*<sup>70</sup>

Für eine selektive und ortsspezifische Biokonjugation von Azobenzolderivaten an Proteine wird oft die kovalente Modifikation von Cysteinresten durch Maleimid-Verbindungen genutzt. Der Grund hierfür ist, dass die Alkylierungsreaktion an Thiolen durch Maleimide hoch spezifisch und effizient verläuft.<sup>78,80,81</sup> Die Modifikationsreaktion wird durch den nukleophilen Angriff des Thiolats<sup>82</sup> auf das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Kohlenstoffatom des Maleimids initiiert, unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung (Abb. 5 B). Aufgrund der Möglichkeit selektiv und ortsspezifisch Maleimid-funktionalisierte Azobenzolverbindungen an definierte Cysteine koppeln zu können, existieren eine Vielzahl synthetisch hergestellter Maleimid-Azobenzolderivate für die Biokonjugation von Proteinen oder anderen Biomolekülen, um deren Funktionen durch einen externen Lichtstimulus kontrollieren zu können. Für die chemische Modifikation von Biomolekülen können je nach Fragestellung monofunktionale oder bifunktionale Maleimid-Azobenzolderivate eingesetzt werden.

### 1.3.2. Monofunktionale Azobenzolderivate

Unter monofunktionalen Azobenzolderivaten werden Verbindungen verstanden, die eine einzige reaktive Gruppe besitzen, über die das jeweilige Derivat kovalent an Aminosäurereste von Proteinen verknüpft werden kann. Basierend auf der gezielten Einführung von Cysteinen, mittels ortsspezifischer Mutagenese, in funktionell wichtige Regionen von Proteinen und deren nachträglichen Modifikation, können verschiedene Funktionen photokontrolliert werden. Mit Hilfe des monofunktionalen Azobenzolderivats 4-Phenylazomaleinanil (4-PAM) konnte bspw. die ATPase-Aktivität von Kinesin<sup>83</sup>, einem Motorprotein sowie die Interaktion zwischen Calmodulin und dem Peptid M13<sup>84</sup> reversibel photokontrolliert werden. Für die Kontrolle der Kinesin-ATPase-Aktivität wurden in zwei Schleifenregionen (L11 und L12), die wichtige Schlüsselregionen für die Motilität des Enzyms darstellen, einzelne Aminosäurepositionen ortsspezifisch zu Cystein mutiert und diese isoliert mit 4-PAM modifiziert. Durch die 4-PAM-Modifikation an Position 272 (L12) konnte die ATPase-Aktivität von Kinesin reversibel durch *cis/trans* Photoisomerisierung um  $\sim 50\%$  kontrolliert werden. Ein ähnliches Vorgehen wurde bei der photokontrollierten Bindung des M13-Peptids durch Calmodulin, einem  $\text{Ca}^{2+}$  bindenden Protein, angewandt. Hierbei wurden in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen (EF-Hand Motife), welche durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine Konformationsänderung bei Calmodulin induzieren und dadurch die Bindung des M13-Peptids ermöglichen, definierte Aminosäurepositionen in Cysteine mutiert und jene einzeln mit 4-PAM modifiziert. Basierend auf der 4-PAM-Modifikation an Position 60 konnte durch *cis/trans* Photoisomerisierung die höchste Bindungsaffinitätsänderung ( $\sim 3$ -fach) erzielt werden.

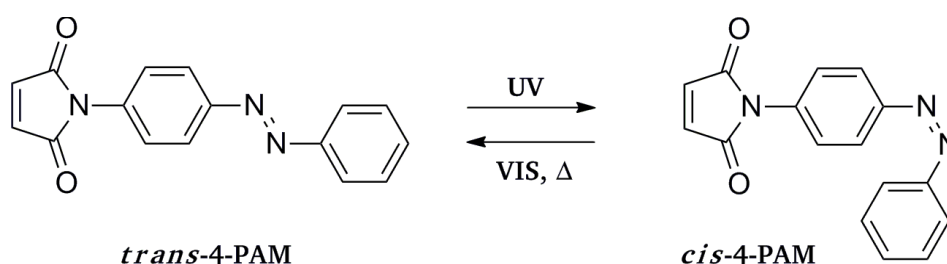
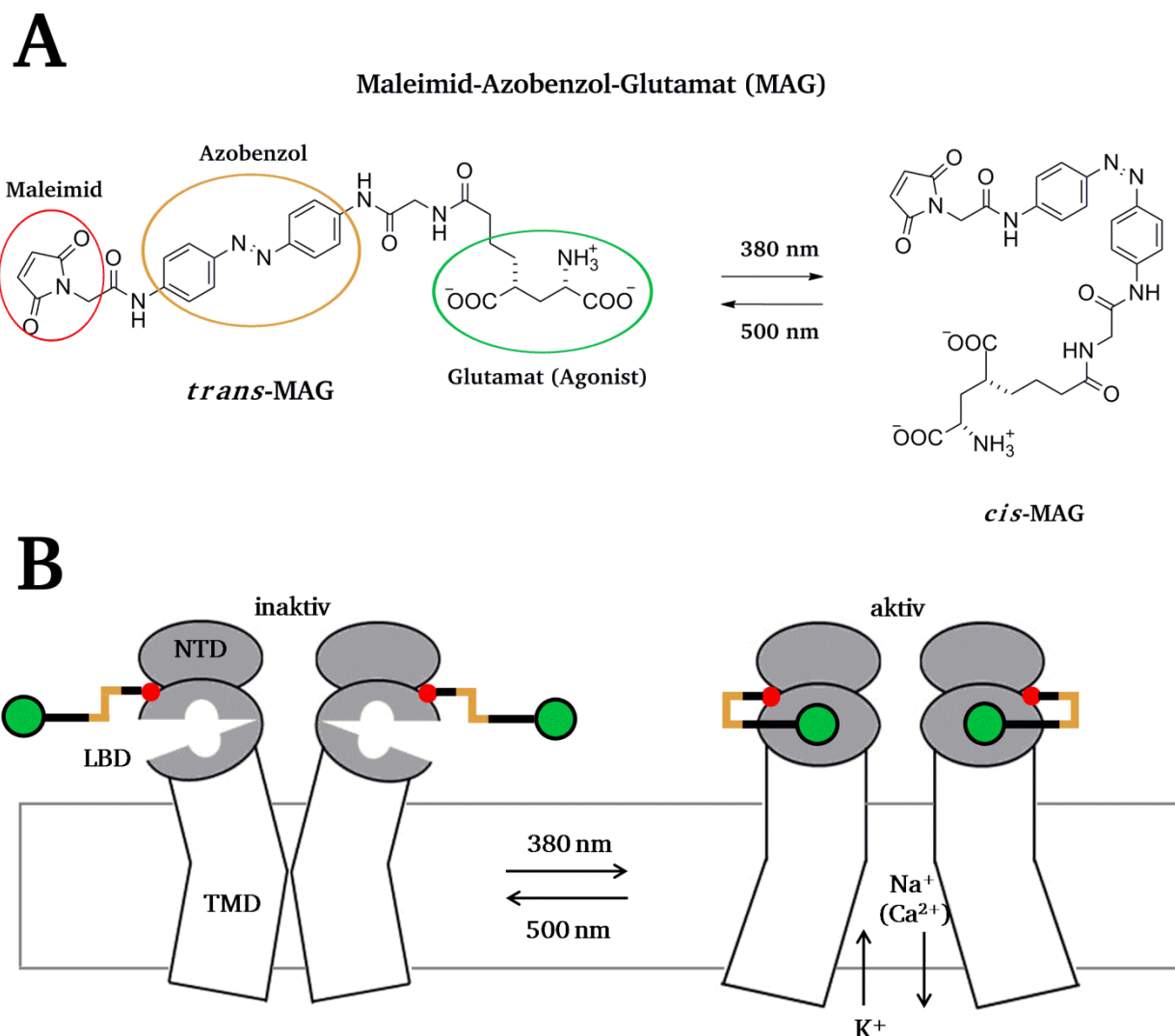


Abb. 6: Schematische Darstellung der reversiblen *cis/trans* Photoisomerisierung von 4-PAM.

Der Einsatz monofunktionaler Azobenzol-Verbindungen findet zudem auch große Anwendung in der Photokontrolle von Ionenkanälen.<sup>18,46,47,85–87</sup> In diesem Zusammenhang werden monofunktionale Azobenzol-Verbindungen mit einem Liganden erweitert (*photoswitchable tethered ligand*, PTL), der in die Bindungstasche des entsprechenden Ionenkanals bindet. PTLs werden im Allgemeinen so designt, dass an der einen Seite der Ligand (Agonist/Antagonist oder Blocker) mittig eine photoisomerisierbare Verbindung (z.B. Azobenzol) und endständig eine reaktive Gruppe (z.B. Maleimid) für die



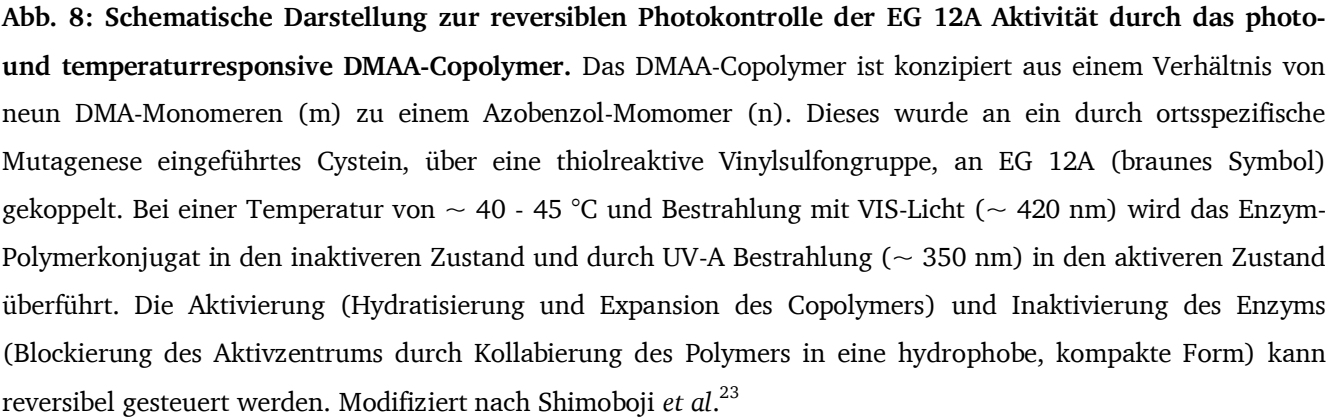
Modifikation selektierter Cysteine eingesetzt wird. Durch die Photoisomerisierung eines selektiv an einen ionotropen Glutamatrezeptor (iGluR6) angekoppelten PTL, ausgestattet mit Glutamat als Agonist, konnte die Aktivierung des iGluR6 reversibel durch Bindung oder den Entzug von Glutamat aus der Bindungstasche aktiviert/inaktiviert werden.<sup>47,85</sup> Der Prozess wurde nachfolgend schematisch dargestellt (Abb. 7).



**Abb. 7: Schematische Darstellung zur Photokontrolle von iGluR6 mittels einer PTL-Verbindung (MAG).** (A) Reversible Photoisomerisierung von freiem MAG. (B) Der iGluR6 ist ein tetrameres Protein, dessen Untereinheiten aus jeweils einer Transmembrandomäne (TMD), einer Liganden-Bindedomäne (LBD) und einer N-terminalen Domäne (NTD) aufgebaut sind. MAG wurde über die Maleimidgruppe kovalent an ein definiertes Cystein gekoppelt. Durch die Photoisomerisierung in *cis*-MAG kann der Agonist Glutamat in der LBD gebunden werden, welches eine Konformationsänderung (geschlossene Konformation) induziert und die Pore allosterisch öffnet. Es folgen der Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  sowie der Ausstrom von  $\text{K}^+$ . Die Photoisomerisierung in die *trans*-Konfiguration führt zu einer Inaktivierung des iGluR6 durch Entzug des Agonisten und der Schließung der Pore. Modifiziert nach Volgraf *et al.*<sup>47</sup>

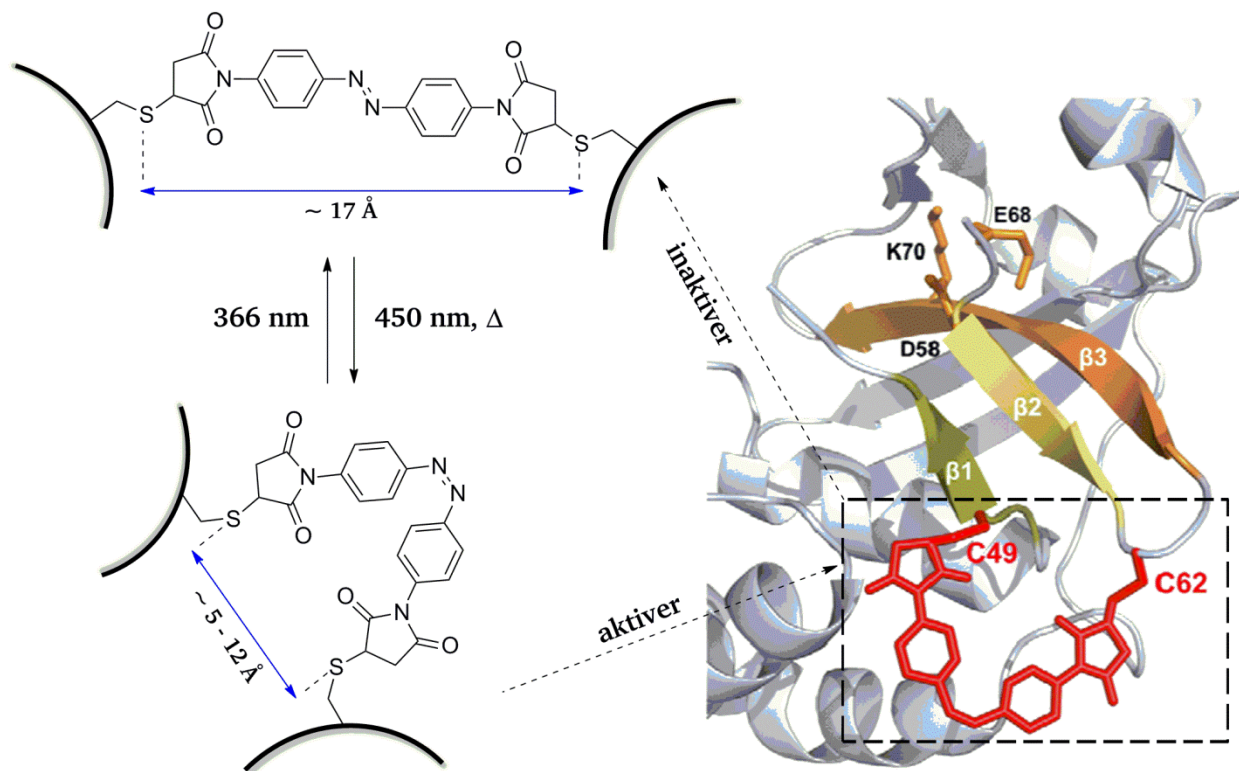
Neben der vereinfachten schematischen Darstellung der reversiblen Lichtkontrolle eines iGluR6 (Abb. 7) ist der Erfolg und die Effizienz einer reversiblen Aktivierung/Inaktivierung sehr von der PTL-Modifikationsstelle und der eingesetzten PTL-Derivate abhängig, die in nächster Nähe zu der Liganden-Bindedomäne angekoppelt werden. Hierbei können unterschiedliche Schaltungsmechanismen auftreten, bei denen die *cis*- als auch die *trans*-Konfiguration eine Aktivierung oder Inaktivierung induzieren kann.<sup>46</sup>

Ergänzend zu kleineren Azobenzolderivaten können Biomoleküle auch mit größeren photosensitiven Polymersystemen modifiziert werden, um bestimmte Funktion spezifisch photokontrollieren zu können. Polymersysteme die allgemein ein sensitives Verhalten gegenüber kleinen physikalischen (z.B. Licht, Temperatur, elektrische Felder) oder chemischen Stimuli (z.B. pH, spezifische Ionen, chemischer Substanzen) aufweisen und dadurch größere Veränderung der Materialeigenschaften induziert werden können, werden als „intelligente“ oder „smarte“ Polymere bezeichnet.<sup>22</sup> Ein Beispiel, bei dem smarte Polymere für die reversible Photokontrolle einer enzymatischen Reaktion eingesetzt wurden, ist das Enzym Endoglukanase (EG) 12A aus *Trichoderma reesei*, welches  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen von Cellulose hydrolysiert.<sup>23</sup> Hierzu wurden zwei photosensitive als auch gleichzeitig temperatursensitive Copolymere, bestehend aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) und *N*-4-Phenylazophenylacrylamid (DMAAm) oder *N*-4-Phenylazophenylacrylat (DMAA), synthetisiert, die an EG 12A über ein durch ortsspezifische Mutagenese eingeführtes Cystein kovalent gekoppelt wurden. Die Modifikation erfolgte über Vinylsulfon-Kopplungschemie. Basierend auf der Copolymerzusammensetzung wurden zwei gegensätzliche Photoschaltungsverhalten der EG 12A Aktivität erzielt, basierend auf deren vorhandenen unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST). Während das DMAA-Copolymer durch UV-A Bestrahlung ( $\sim 350$  nm) und bei  $\sim 40$ - $45$  °C als lösliche und längenexpandierte Knäulstruktur vorkommt (EG 12A = aktiv), führt VIS-Bestrahlung (450 nm) zu einer Kollabierung des Copolymers in eine hydrophobe und kompakte Konformation (EG 12A = inaktiv) und damit zur sterischen Blockierung des Aktivzentrums (Abb. 8). Das Photoschaltungsverhalten bei dem DMAAm-Copolymer verhält sich zu DMAA invers.





Durch die Photoisomerisierung von der *cis*- in die *trans*-Konfiguration konnte die *scPvuII*-Endonukleaseaktivität um maximal  $\sim 16$ -fach reduziert werden.



**Abb. 10: Reversible Photokontrolle der Endonukleaseaktivität einer *scPvuII*-Variante durch *cis/trans* Photoisomerisierung eines Azobenzolderivats.** Schematische Darstellung der reversiblen Photoisomerisierung des bifunktionalen Maleimid-Azobenzolderivats 4,4'-bis(maleimido)azobenzol, gekoppelt an *scPvuII* und der damit verbundenen Distanzänderung zwischen den beiden endständig gelegenen Schwefelatomen (**links**). Quervernetzung der zwei ortsspezifisch eingeführten Cysteine (C49 & C62) in der N-terminalen Hälfte von *scPvuII* durch das bifunktionale Azobenzolderivat (**rechts**). Durch *cis/trans* Photoisomerisierung werden Konformationsänderungen auf die illustrierten  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ) ausgeübt und infolge dessen die geometrische Anordnung der Aminosäurereste im Aktivzentrum (D58, E68 und K70, orange gefärbt) beeinflusst. Modifiziert nach Schierling *et al.*<sup>88</sup>

#### 1.3.4. Inkorporation einer photoschaltbaren Aminosäure

Ergänzend zu der Strategie, Proteinfunktionen durch chemische Modifikation mit mono- oder bifunktionalen Azobenzolderivaten zu photokontrollieren, existiert zudem die Möglichkeit eine photoschaltbare Aminosäure wie Phenylazophenylalanin (Abb. 11) ortsspezifisch in Proteine einzubauen. Die Inkorporation der unnatürlichen Aminosäure kann unter anderem mit Hilfe eines *in*

*vitro* Translationssystemen<sup>94</sup> bewerkstelligt werden, welches auf tRNA-basierter Suppression beruht. Durch diese Vorgehensweise konnte beispielsweise die Aktivität des homodimeren Restriktionsenzyms *Bam*HI durch Störung der Dimerisierung<sup>95</sup> die Bindungsaffinität eines Transkriptionsfaktors (*catabolite activator protein*, CAP) an dessen Promotorsequenz<sup>96</sup> sowie die Aktivität von Ribonuklease S Mutanten<sup>12</sup> photokontrolliert werden.

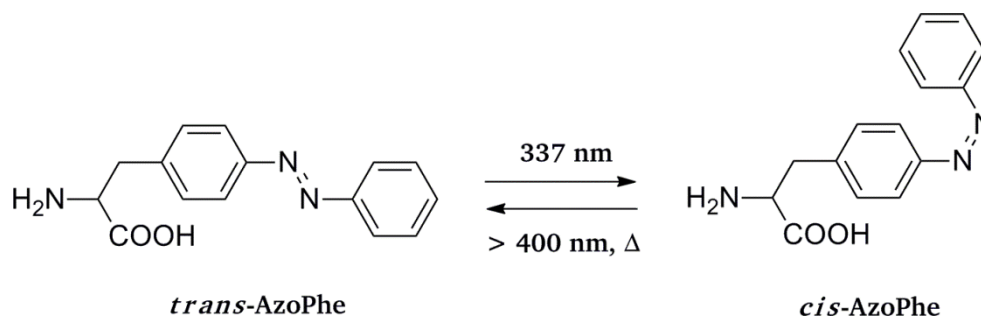


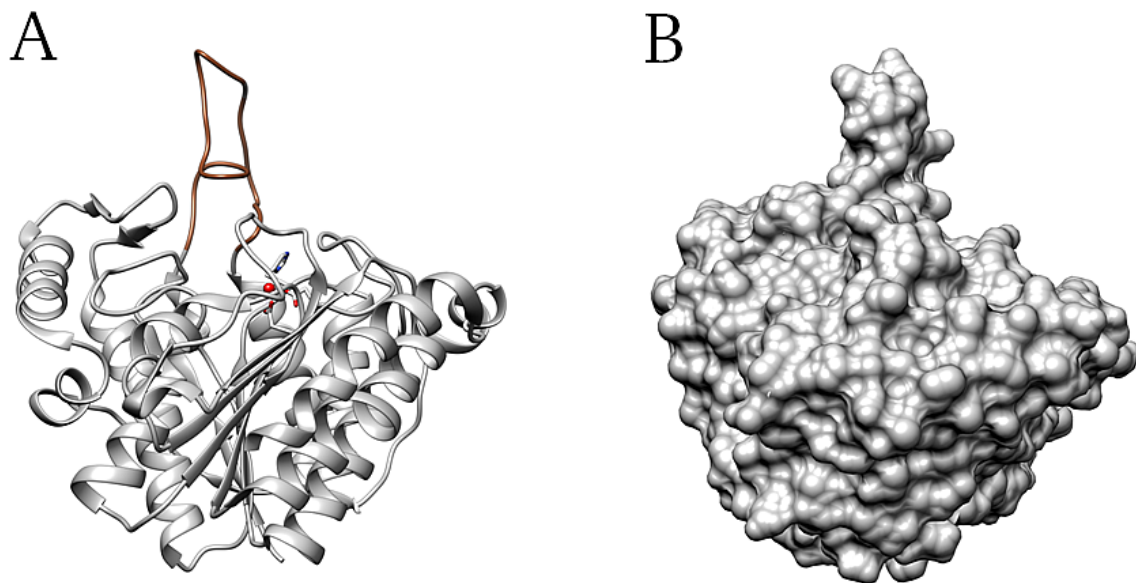
Abb. 11: Reversible *cis/trans* Isomerisierung der photoschaltbaren, unnatürlichen Aminosäure Phenylazophenylalanin (AzoPhe). Modifiziert nach James *et al.*<sup>12</sup>

#### 1.4. Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase

Die Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase (HDAH) aus *Bordetella* oder *Alcaligenes* (*Bordetella/Alcaligenes*) Stamm FB188 (DSM 11172) ist ein bakterielles Enzym, dass in einem industriellen Screening-Programm für neue Biokatalysatoren entdeckt wurde (Abb. 12).<sup>97</sup> Hierbei wurde ein Biokatalysator gesucht, der für die Synthese von *cis*-(1S,4R)-(4-aminocyclopent-2-enyl)methanol eingesetzt werden kann, einer Vorläufersubstanz für die Synthese des humanen Immundefizienz-Virus reverse Transkriptase Inhibitors „Abacavir“. Die FB188 HDAH katalysiert die Deacetylierung von  $\epsilon$ -Acetyl-L-Lysinseitenketten von Histon und Nicht-Histonproteinen unter Produktbildung von L-Lysin und Acetat. Im Vergleich zu den Histondeacetylase (HDACs), deren Hauptaufgabe es ist, in Eukaryoten Zellkern lokalisierte Histone zu deacetylieren und diese damit eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsregulierung einnehmen,<sup>98</sup> ist die physiologische Funktion von FB188 HDAH nicht bekannt. Als natürliches Target der FB188 HDAH wurde ein acetyliertes Protein mit einer Masse von  $\sim 65$  kDa angedeutet, welches jedoch nicht weiter spezifiziert wurde.<sup>97</sup> Das FB188 HDAH-Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 1110 bp (369 Aminosäuren), das für ein Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 39,421 kDa kodiert. Die FB188 HDAH kommt als Monomer vor, weist ein Aktivitätsoptimum bei pH 8 auf und ist ein  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängiges Enzym, dessen  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion in einem Tunnel-ähnlichen Aktivzentrum über ein Histidin (H182) und zwei Aspartat-Reste (D180 & D268) koordinativ gebunden vorliegt.<sup>97,99</sup> Basierend auf einem kombinierten strukturellen Vergleich von HDACs 2, 4, 7 und 8 sowie drei bakteriellen HDAC-ähnlichen Enzymen, FB188 HDAH, Histondeacetylase-ähnliches Protein (HDLp) und Acetylpolymethin Amidohydrolase (APAH), wurde ein allgemeiner

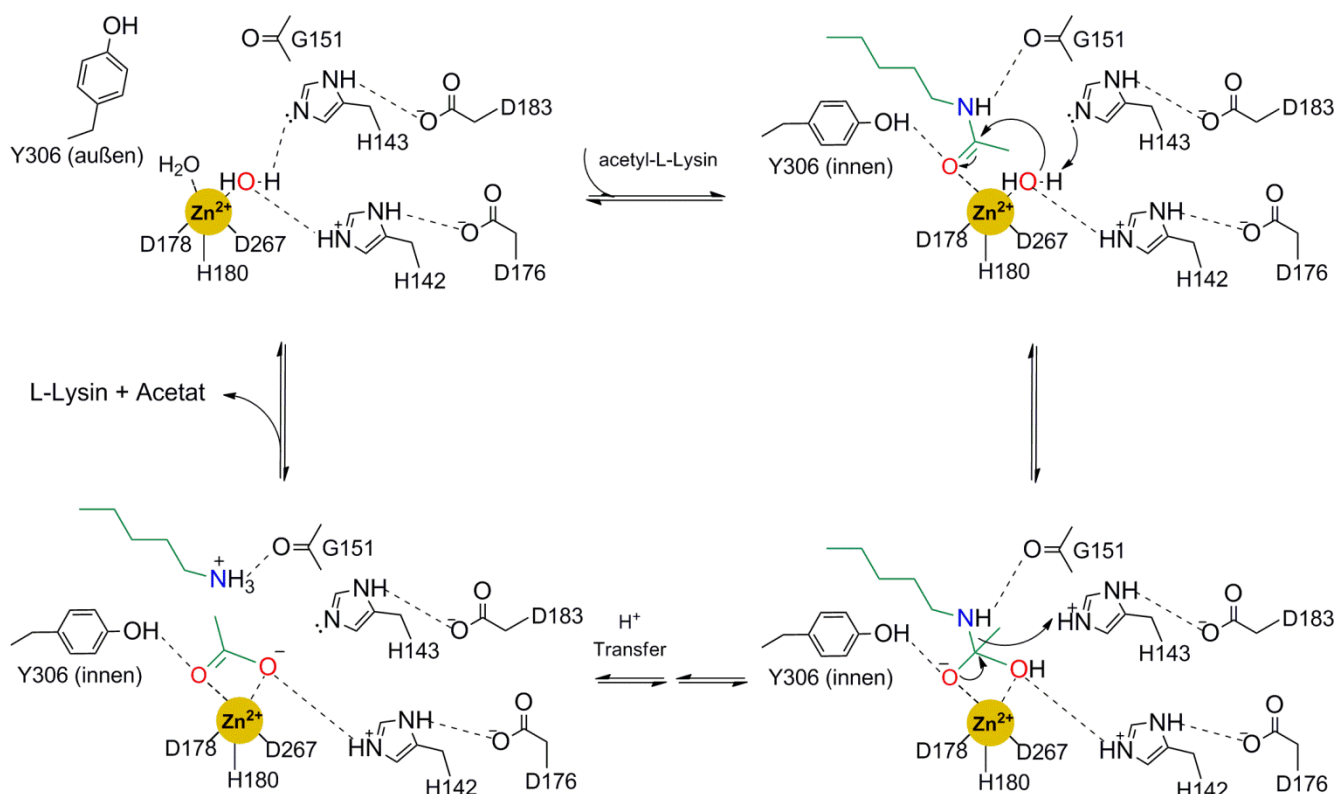


Katalysemechanismus für die Metall-abhängige Hydrolyse acetylierter Verbindungen vorgeschlagen (Abb. 13).<sup>100</sup>



**Abb. 12: Kristallstruktur von FB188 HDAH (A) und Darstellung der Oberfläche (B).** Das Aktivzentrum ist durch das katalytische Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ , rote Kugel) dargestellt (A), welches durch ein Histidin (H182) und zwei Aspartatreste (D180 und D268) koordinativ gebunden wird. Die flexible Schleifenregion (Aminosäuren 16-38)<sup>99</sup> wurde in braun dargestellt. Proteindatenbank-Identifikationscode (PDB ID): 2VCG, Kette A.<sup>101</sup>

Der Deacetylierungsmechanismus von  $Zn^{2+}$ -abhängigen HDACs und HDAH-ähnlichen Enzymen beginnt mit der Koordination eines Wassermoleküls, über dessen Sauerstoffatom, an das  $Zn^{2+}$ -Ion. In Anwesenheit von Substrat wird das zweite gebundene Wassermolekül verdrängt und die Polarisierung des Substrat-Carbonylkohlenstoffatoms durch Koordination an  $Zn^{2+}$  sowie durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu Y306 induziert. Durch H143 wird der allgemein Basen-vermittelte nukleophile Angriff von dem an  $Zn^{2+}$ -gebundenen Wassermolekül an das polarisierte Carbonylkohlenstoffatom initiiert. Das tetraedisch ausgebildete Intermediat des Oxyanions wird durch  $Zn^{2+}$ -Koordination sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit Y306, H143 und H142 stabilisiert. Das  $\epsilon$ -Stickstoffatom des Lysinrests abstrahiert ein Proton von H143, was zu einer Kollabierung des tetraedischen Intermediats und damit zur Freisetzung von L-Lysin und Acetat führt.<sup>100,102</sup>



**Abb. 13: Allgemein vorgeschlagener Katalysemechanismus für Zink-abhängige HDACs und HDAC-ähnlichen Enzymen.** Dargestellt ist die aktuell anerkannte, sequentiell katalysierte Deacetylierungsreaktion eines Acetyl-L-Lysin Substrats (nur Seitenkette gezeigt), illustriert an dem Aktivzentrum von HDAC8. Hierbei wird spekuliert, dass die Seitenkette von Y306 eine mögliche Konformationsänderung in eine nach „außen“ und „innen“ gerichtete Konformation durchlaufen kann, zur Anpassung der Substratbindung und der Katalyse. Modifiziert nach Lombardi *et al.*<sup>100</sup> In Anlehnung an den dargestellten Katalysemechanismus wird im Detail bei FB188 HDAH das katalytische  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion durch H182, D180 und D268 koordinativ gebunden, Y306 entspricht Y312 und als Charge-Transfer-Relay-Systeme werden D178-H142 und N185-H143 vorgeschlagen.<sup>99,102</sup>

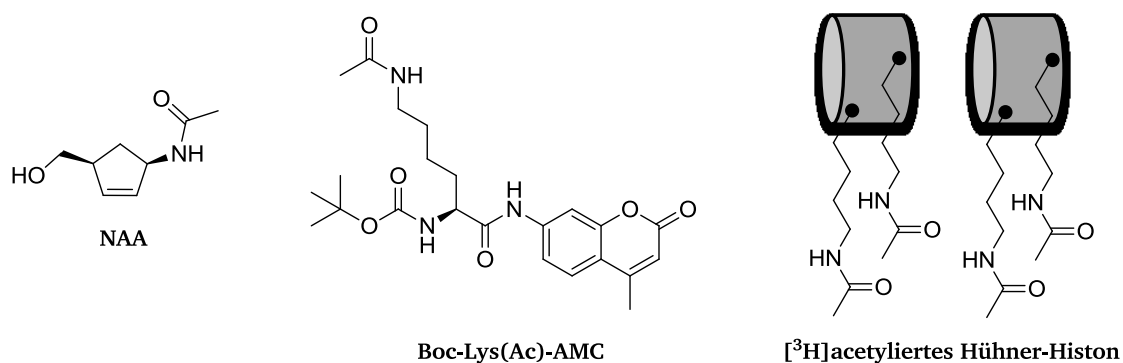
Allgemein wird die FB188 HDAH der HDAC-Superfamilie untergeordnet.<sup>97</sup> Die HDAC-Superfamilie beinhaltet HDACs der Klasse I und II,<sup>103</sup> Acetoin verwertende Proteine, und APAH.<sup>104</sup> Alle drei Proteinklassen besitzen eine Anzahl gemeinsamer Proteinmotive und funktionelle Ähnlichkeiten, wie die Erkennung von acetylierten Aminoalkylgruppen und die Entfernung der Acetylgruppe durch Spaltung einer Amidbindung.<sup>97</sup> Die Mammalia HDACs werden sequenzbasierend in vier Familien unterteilt (Klasse I, IIa, IIb und IV), die sich in ihrer Struktur, der enzymatischen Funktion, subzellulärer Lokalisation und Expressionsmustern unterscheiden. Neben den klassischen HDACs existiert eine weitere Gruppe von Deacetylasen, die Sirtuine, welche manchmal als Klasse III HDACs bezeichnet werden.<sup>105</sup> Während die HDACs der Klassen I, II und IV  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängige Enzyme darstellen, sind die HDACs der Klasse III NAD-abhängig.<sup>106</sup> In Bezug auf die humanen und  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen HDACs konnten für FB188 HDAH Sequenzhomologien mit HDAC6<sup>107</sup> (Klasse IIb), einer  $\alpha$ -Tubulin Deacetylase, nachgewiesen (35 % Identität über 291 Aminosäurereste) sowie signifikante



Sequenzhomologien mit den APAHs identifiziert werden, insbesondere bei den putativen Enzymen von *Pseudomonas aeruginosa* (47 % Identität über 328 Aminosäurereste) und *Archaeoglobus fulgidus* (41 % Identität über 221 Aminosäurereste).<sup>97</sup> Darüber hinaus kann die FB188 HDAH-Aktivität durch bekannte HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A und Suberoylanilid Hydroxamsäure (SAHA) inhibiert werden.<sup>97</sup> Ab dem nächsten Abschnitt wird für eine bessere Lesbarkeit die FB188 HDAH nur noch als HDAH bezeichnet.

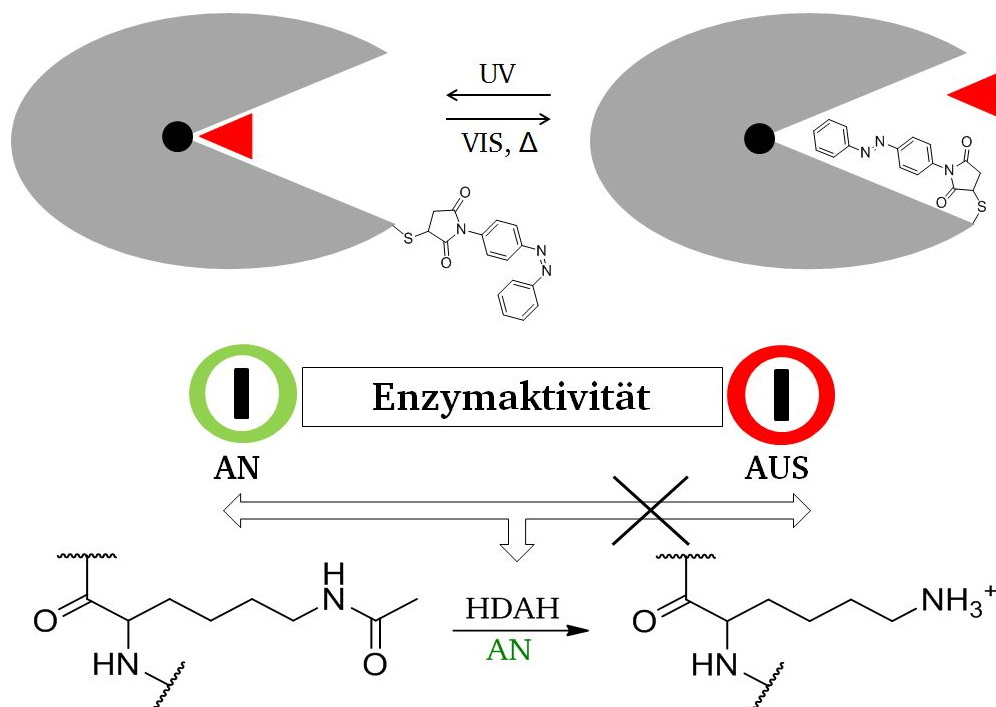
## 1.5. HDAH als photoschaltbarer Biokatalysator

Durch die Kontrolle von Enzymen mit einem externen Lichtstimulus könnten enzymatische Reaktionen in präziser Art und Weise zeitlich und ortsaufgelöst gesteuert werden. In diesem Zusammenhang könnten chemische Prozessreaktionen von Biokatalysatoren überwacht und individuell reguliert werden. HDAH ist aufgrund des vielseitigen Substratspektrums und der Eigenschaft bei unterschiedlichen pH-Werten katalytisch aktiv zu sein<sup>97</sup> ein interessanter Biokatalysatorkandidat für die photokontrollierte Deacetylierungsreaktion verschiedenster Biomoleküle und Verbindungen in biotechnologischen und biomedizinischen Applikationen. Substrate, die von HDAH deacetyliert werden können, sind bspw. niedermolekulare Verbindungen wie *cis*-(1S,4R)-N-[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamid (NAA), welches eine Vorläufersubstanz für ein Synthon in der Abacavir-Synthese darstellt, peptidische Substrate wie Boc-Lys(Ac)-7-Amino-4-Methylcoumarin (Boc-Lys(Ac)-AMC) und Hühner-Histone (Abb. 14). Polyamine werden nur moderat umgesetzt.<sup>97</sup>



**Abb. 14: Substrate von HDAH.** Das peptidische Substrat Boc-Lys(Ac)-AMC wird standardmäßig in einem fluoreszenzbasierten Test<sup>108,109</sup> zur Bestimmung der HDAH-Deacetylaseaktivität verwendet. Modifiziert nach Hildmann et al.<sup>97</sup>

Für die Entwicklung einer photoschaltbaren HDAH wurde die Strategie der chemischen Kopplung eines monofunktionalen Azobenzolderivats (4-PAM) gewählt. Die Überlegung hierbei war 4-PAM selektiv an definierte Cysteine zu koppeln, die mittels ortsspezifischer Mutagenese in die Nähe des Aktivkanaleingangs eingeführt werden sollen. Durch *cis/trans* Photoisomerisierung von 4-PAM soll der Aktivkanaleingang sterisch blockiert und darüber eine reversible Inaktivierung und Aktivierung der HDAH-Aktivität erzielt werden. Dies wurde schematisch in Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 15: Schematische Darstellung für die potentiell reversible Photokontrolle der HDAH-Aktivität durch 4-PAM.** Die Modifikation von 4-PAM an HDAH (graues Symbol) erfolgt über ein definiertes, Lösungsmittel zugängliches Cystein in der Nähe des Aktivkanals. Die Photoisomerisierung von 4-PAM in die *cis*-Konfiguration führt zu einer Aktivierung von HDAH (AN, grüner Kreis) und damit zur Deacetylierung der  $\epsilon$ -acetylierten L-Lysin Seitenkette. Die Inaktivierung/Aktivierung von HDAH wird durch sterische Blockierung der Aktivkanaleintrittsfläche reguliert, durch Hinderung von Substratbindung. Die *trans*-Konfiguration hingegen führt zu einer Inaktivierung des Enzyms (AUS, roter Kreis). Rotes Dreieck = Substratmolekül, schwarzer Punkt = Aktivzentrum (gebundenes  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion). Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Basierend auf der relativ hohen räumlichen Flexibilität von 4-PAM gegenüber bifunktionalen Azobenzolderivaten sollen zudem Erkenntnisse über Interaktionen des Photoschalters und der Proteinoberfläche gewonnen werden, die zur Charakterisierung des reversibel stattfindenden Schaltvorgangs beitragen können. Dies ist vor allem interessant in Bezug auf die stattfindende thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von Azobenzolderivaten an Biomolekülen, die je nach Azobenzolderivat und Biomolekül unterschiedlich schnell sein kann. Im Falle einer Aktivierung durch

die metastabile *cis*-Konfiguration und einer stattfindenden Inaktivierung durch die thermodynamisch stabilere *trans*-Konfiguration wird bei schneller thermischer *cis*-zu-*trans* Relaxation des angekoppelten Azobenzolderivats das Enzym nach einer bestimmten Zeit automatisch inaktiviert. Findet die thermische Relaxation zu schnell statt, so müsste für die Aufrechterhaltung des aktiven *cis*-Zustands dauerhaft UV-Licht eingebracht werden, welches potentiellen Schaden auf biologische Systeme ausüben könnte. Aus diesem Grund sind besonders verlangsamte thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationen mit Halbwertszeiten im zweistelligen Stundenbereich wertvoll, welche die Photokontrolle biologischer Funktionen durch einen einfachen Lichtimpuls ermöglichen, anstelle von permanent notwendiger UV-Bestrahlung.

---

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

---

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Aktivität eines Biokatalysators durch einen externen Lichtstimulus in einem wässrigen System reversibel gesteuert werden kann. Als Biokatalysator und Modellsystem sollte die HDAH verwendet werden, die in einem industriellen *Screening* entdeckt und als substratdiverses und relativ pH-robustes Enzym identifiziert wurde. Hierbei sollte eine Schaltungsstrategie geprüft werden, bei der die Aktivkanaleintrittsfläche des Biokatalysators durch *cis/trans*-Photoisomerisierung eines monofunktionalen Azobenzol-Maleimid-Derivats (4-PAM) reversibel und sterisch blockiert werden kann, um damit eine lichtgesteuerte Inaktivierung und Aktivierung der HDAH katalysierten Deacetylierungsreaktion systematisch kontrollieren zu können. Aufgrund der bis dato wenig vorliegenden Erkenntnisse über Interaktionen von photoschaltbaren Azobenzolderivaten mit Proteinoberflächen sollte in einem weiteren Schritt der dabei vorherrschende Photoschaltungsmechanismus auf molekularer Ebene näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten in Ergänzung zu dem erwähnten photoschaltbaren Molekül 4-PAM weitere photoschaltbare 4-PAM-Derivate und deren Auswirkung auf die Photoschaltungseffizienz der HDAH-Konjugat Aktivität getestet werden.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
4-Phenylazomaleinanil (4-PAM; Reinheit: 95 %)	Alfa Aesar, Karlsruhe
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Aceton, $\geq 99.5$ % zur Synthese	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid, 4K-Lösung (30 %), Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agar-Agar	Otto Nordwald, Hamburg
Agarose, LE	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Amp), Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
BCA Reagenz A	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Boc-Lys(Ac)-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Bromphenolblau, Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA) Standardlösung (2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chelating Sepharose fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Dimethylsulfoxid (DMSO), 99.7+%, extra dry	Thermo Fisher Scientific, Belgien
DMSO-d <sub>6</sub> , D-99.9 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt, granuliert	Merck, Darmstadt
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
LB ( <i>lysogeny broth</i> )-Medium nach Lennox	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Methoxypolyethylen Glycol Maleimid (5000 g/mol), $\geq 90$ % (NMR)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Midori Green Advance	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pepton	AppliChem, Darmstadt
Pluronic F 68	BASF, Ludwigshafen
Salzsäure 37 %, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Wasser-D <sub>2</sub> , D-99.9 %	Deutero, Kastellaun
Zinkchlorid	AppliChem, Darmstadt

## 2.2. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser Typ I (Milli-Q, Merck Millipore) hergestellt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
4-PAM bzw. Azobenzolalkyl-Maleimid-Derivat (AMD) <b>1a-e</b> -Kopplungslösungen	5 mM in DMSO
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in 50 % Ethanol, sterilfiltriert
BCA Reagenz B	160 mM CuSO <sub>4</sub>
Boc-Lys(Ac)-AMC-Stammlösung	50 mM in DMSO
Coomassieblau-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
Coomassieblau-Färbelösung	0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
DNA-Auftragspuffer, pH 7.6 (6-fach)	0.03 % (w/v) Bromphenolblau 60 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 60 % (v/v) Glycerin
DTT-Stammlösung	1M DTT in H <sub>2</sub> O
Elutionspuffer 1, pH 8.0	100 mM NaCl 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 60 mM Imidazol  Hergestellt aus IMAC1- und IMAC2-Puffer in einem Mischungsverhältnis von 47:3.
Elutionspuffer 2, pH 8.0	100 mM NaCl 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 500 mM Imidazol  Hergestellt aus IMAC1- und IMAC2-Puffer in einem Mischungsverhältnis von 1:1.

FB188-Puffer, pH 8.0	15 mM TRIS 150 mM NaCl 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 250 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2$ -EDTA 0.005 % (w/v) BSA 0.001 % (v/v) Pluronic F 68
IMAC1-Puffer, pH 8.0	100 mM NaCl 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
IMAC2-Puffer, pH 8.0	100 mM NaCl 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1 M Imidazol
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in $\text{H}_2\text{O}$ , sterilfiltriert
MK-Puffer, pH 7.2	1 mM $\text{Na}_2$ -EDTA 150 mM NaCl 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$
MKA-Puffer, pH 7.2	1 mM $\text{Na}_2$ -EDTA 150 mM NaCl 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.005 % (w/v) BSA 0.001 % (v/v) Pluronic F 68
Protein-Auftragspuffer, pH 6.8 (2-fach)	0.04 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 4 % (w/v) SDS 100 mM TRIS
SDS-Elektrophoresepuffer, pH 8.9 (10-fach)	1.92 M Glycin 250 mM TRIS 1 % (w/v) SDS



SOC-Medium	0.5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Pepton 20 mM Glukose <sup>*</sup> 2.5 mM KCl 10 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> <sup>*</sup> 10 mM MgSO <sub>4</sub> <sup>*</sup>  <sup>*</sup> = Bestandteile wurden nach Autoklavieren der Lösung sterilfiltriert hinzugeben.
TAE-Puffer, pH 8.5 (50-fach)	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1 M Essigsäure 2 M TRIS
TFB1-Medium, pH 5.8	10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 30 mM KOAc 15 % (w/v) Glycerin
TFB2-Medium, pH 7.0	75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 10 mM Na-MOPS 15 % (w/v) Glycerin
TRIS-HCl Puffer, pH 8.5	10 mM TRIS, autoklaviert
Trypsin-Lösungen	6 mg/ml in MKA-Puffer 5 mg/ml in FB188-Puffer
TYM-Medium	0.5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM MgSO <sub>4</sub> 100 mM NaCl

ZnCl<sub>2</sub>-Lösung für IMAC, pH 7.5100 mM ZnCl<sub>2</sub>ZnCl<sub>2</sub> wurde in 20 mM TRIS-HCl Puffer (pH 7.5) gelöst

### 2.3. Enzyme und Proteine

Bezeichnung	Hersteller
BSA ( <i>Albumin bovine Fraction V, Protease-free</i> )	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA (Albumin Fraktion V, pH 7.0)	AppliChem, Darmstadt
BSA (fettsäure- und globulinfrei, ≥ 99 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>DpnI</i> (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase (5 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>EcoRI</i> (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>NdeI</i> (10 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2.5 U $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
T4 DNA Ligase (1 Weiss Einheit $\mu\text{l}^{-1}$ )	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.4. DNA und Proteingrößenstandards

<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>PageRuler Unstained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

### 2.5. Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA

### 2.6. Kits

E.Z.N.A. <i>Gel Extraction Kit</i>	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
E.Z.N.A. <i>Plasmid Mini Kit</i>	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
<i>GenElut PCR Clean-Up Kit</i>	Sigma-Adrich, Steinheim

Pierce BCA Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Die Durchführung der aufgelisteten Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.7. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
8er-Plastikkavitätsstreifen, Nunc-Immuno <i>Loose Well Module</i> , MaxiSorp	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
96-Well <i>half-area</i> Mikrotiterplatten, schwarz ( <i>flat bottom, polystyrene, medium-binding</i> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrospitzenfilter Filtropur (0.22 $\mu\text{m}$ /0.45 $\mu\text{m}$ )	Sarstedt, Nümbrecht
Omnifix Solo, Luer Lock Spritzen (10 ml)	Braun, Melsungen
Plastikküvetten für Trübungsmessung (Model: 67.742)	Sarstedt, Nümbrecht
Servapor Dialyseschläuche, RC, 12 - 14 kDa MWCO	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Vivaspin 2 Säulen, 20000 MWCO PES	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

## 2.8. FB188 HDAH-Gen und verwendete Vektoren

### FB188 HDAH-Gen

Das aus *Bordetella/Alcaligenes* Stamm FB188 (DSM 11172) kodierende Gen für FB188 HDAH wurde mit einem N-terminal gelegenen hexa-Histidin-Tag (*His<sub>6</sub>-Tag*) in dem Vektor pQEB-MCS von A. Schwienhorst und C. Hildmann (Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Das FB188 HDAH-Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 1110 bp (369 Aminosäuren) und kodiert für eine Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase mit einem theoretisches Molekulargewicht von 39,421 kDa.<sup>97</sup>

### pQEB-MCS Vektor

Der pQEB-MCS Vektor stellt ein Derivat des kommerziell erhältlichen pQE-70 Vektors (Qiagen) dar, dessen *Multiple Cloning Site* (MCS) um diverse Restriktionsschnittstellen erweitert wurde. Der genannte Vektor besitzt eine Größe von 3463 bp, beinhaltet ein T5 Promotor/*lac* Operator

Transkriptions-Translationssystem sowie eine Ampicillinresistenz, vermittelt durch das  $\beta$ -Lactamase-Gen.<sup>110</sup>

### pET-22b(+)-Vektor

Der pET-22b(+) Vektor (Novagen) besitzt eine Größe von 5493 bp, beinhaltet ein T7 Promotor/*lac* Operator Transkriptions-Translationssystem, eine *pelB* Signal Sequenz, welche für potentielle periplasmatische Lokalisation genutzt werden könnte sowie eine Ampicillinresistenz, vermittelt durch das  $\beta$ -Lactamase-Gen. Die *pelB* Signal Sequenz wurde aus dem pET-22b(+) Vektor durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *EcoRI* entfernt und das FB188 HDAH-Wildtyp (Wt) Gen über die zuvor genannten Restriktionsschnittstellen eingefügt.

## 2.9. Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Absorptions-Mikro-platten-Reader	Digiscan 340	Asys Hitech, Cambridge, England
Agarosegel-Elektrophoresekammer	VWR 101202 102	VWR, Darmstadt
Autoklav	2540EL Varioklav Dampfsterilisator	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bandpassfilter	$340 \pm 10$ nm und $450 \pm 10$ nm, $\varnothing = 1$ cm	PerkinElmer, Rodgau
Blaulichthandlampe	Decospot LED, 1 W, E14, 50 - 60 Hz, Blue 12°	Osram, München
Brutschrank	TV60uL	Memmert, Schwalbach
Digital Sonifier Cell Disruptor	Digital Sonifier 250 (200 W)	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Fluoreszenz-Mikro-platten-Reader	PERAstar Plus	BMG Labtech, Ortenberg

Fluid-Lichtleiter	Serie 300, $\varnothing$ 5 mm x 1500 mm	Lumatec, Deisenhofen
Flüssigchromatographiesystem	ÄKTApriM Plus	GE Healthcare, Freiburg
Gel-Imager mit UV-Tisch	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen
Glas-Erlenmeyerkolben	100 - 2000 ml, 4 Schikanen	Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lengeln
Infrared Imaging System	Odyssey SA	LI-COR, Bad Homburg
IMAC-Glassäule	C-10/10-Säule	GE Healthcare, Freiburg
Kurzlichtbogen Quecksilberdampf-Hochdrucklampe	200 W DC, Superlite SUV-DC-E	Lumatec, Deisenhofen
LC-MS	Shimadzu LCMS-2020	Shimadzu, Weiterstadt
Netzgeräte	EPS 600 VWR Power Source 250 V	PharmaciaBiotech, Schweden VWR, Darmstadt
NMR-Spektrometer	600.4 MHz Bruker Avance III	Bruker BioSpin, Karlsruhe
Peltier-Element	Jasco ETC-717	JASCO, Gross-Umstadt
PCR-Thermocycler	TGradient Thermocycler 96	Biometra, Göttingen
pH-Elektrode	blueLine 14pH	SI Analytics, Mainz
pH-Meter	pH-526 Multical	WTW, Weilheim
Quarzglas-Küvetten	105.200-QS, Schichtdicke: 10 mm Zentrumshöhe: 15 mm, schwarz	Hellma Analytics, Müllheim
	Eppendorf $\mu$ Cuvette G1.0, Schichtdicke: 1 mm, schwarz	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Aerotron SM 30 A	Infors, Bottmingen Edmund Bühler, Hechingen

SDS-PAGE-Elektrophoresekammer	<i>Mini-Protean 3 Cell</i>	Bio-Rad, München
Spektropolarimeter	Jasco J-810	JASCO, Gross-Umstadt
Spektroradiometer	specbos 1211 UV	JETI Technische Instrumente
Ultraschalbad	Sonorex RK 100	Bandelin electronic, Berlin
UV-A Strahlungsquelle	6 W, UV-A Röhre 366 nm, Blacklite 350	Sylvania, England
UV-Lampengehäuse	Original Hanau Fluotest	Heraeus, Hanau
UV/Vis-Spektrophotometer	Jasco V-630 <i>BioSpectrometer</i> Specord S 600 (mit DAD-Detektor)	JASCO, Gross-Umstadt Eppendorf, Hamburg Analytic Jena, Jena
Wasseraufbereitungsanlagen	Milli-Q Biocel A10 Umkehrosmoseanlage R100	Millipore, Schwalbach Millipore, Schwalbach
Zentrifugen	3K30C 6K15 Mini Spin	Sigma, Osterode am Harz Sigma, Osterode am Harz Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenbecher	mit Verschlussdeckel, 500 ml	Nalgene, Rochester, USA

## 2.10. Computerprogramme

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller / Quelle
Bruker TopSpin (V. 3.1)	Aufnahme und Auswertung von NMR-Spektren	Bruker
CASTp	Berechnung von Kanaleintrittsflächen	Dundas <i>et al.</i> <sup>111</sup>
ChemBioDraw Ultra (V. 12.0)	Visualisierung chemischer Strukturen	PerkinElmer
Chimera (V. 1.6.1)	Visualisierung und Analyse von 3D-Proteinstrukturen	Pettersen <i>et al.</i> <sup>112</sup>

Chromas Lite (V. 2.01)	Darstellung von DNA-Sequenz- chromatogrammen	Technelysium
GraphPad Prism (V. 5.03)	Statistische Datenanalyse, Auswertung und graphische Darstellung von Ergebnissen	GraphPad Software
ImageJ (V. 1.45s)	Quantifizierung von Proteinbanden nach SDS-PAGE	<i>National Institute of Health</i>
LCMSsolution	Aufnahme von Massenspektren	Shimadzu
Serial Cloner (V. 2.5)	DNA-Sequenzanalyse und Auswertung	SerialBasics
MestReNova (V. 6.0.2)	Darstellung und Auswertung von NMR-Spektren	Mestrelab Research S.L.
MS Office (V. 2007)	Präsentationen, Berichte, Auswertung	Microsoft
MikroWin 2000 (V 4.38)	Bestimmung von Protein- konzentrationen	Mikrotek
Spectra Manager (V 12.10.01 )	Analyse und Auswertung von UV/Vis-Spektren	JASCO
VMD (V 1.9.1)	Analyse und Auswertung von MD-Simulationsdaten	Humphrey <i>et al.</i> <sup>113</sup>
YASARA (V 12.7.6)	Durchführung von MD-Simulationen	YASARA Biosciences Krieger & Vriend <sup>114, 115</sup> , Krieger <i>et al.</i> <sup>93</sup>

## 2.11. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden Kartuschen- oder mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt von der Firma Biomers (Ulm) bezogen und die Oligonukleotid-spezifischen Parameter dem jeweiligen Datenblatt entnommen. Entsprechende Oligonukleotide wurden für ortsspezifische Mutagenese-Experimente zur Entwicklung photoschaltbarer HDAH-Varianten (Tab. 2) und zur Untersuchung der *cis*-4-PAM Konfigurationsstabilisierung sowie des Photoschaltungsmechanismus an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche (Tab. 3) eingesetzt. Darüber hinaus wurden Oligonukleotide für Restriktionsschnittstellenerweiterungen (Tab. 4) und für Sequenzierungen (Tab. 5) verwendet. Alle

Primer sind in 5'-3' Leserichtung angegeben und die für die Aminosäuresubstitution erforderlichen Codons (Tab. 2 & Tab. 3) sowie Restriktionsschnittstellen (Tab. 4) hervorgehoben. Als *Forward*-Primer (FP) wurden Oligonukleotide bezeichnet, die in 5' → 3' Leserichtung an den Leitstrang der zu amplifizierenden DNA-Matrize hybridisieren und als *Reverse*-Primer, Oligonukleotide die in 3' ← 5' Leserichtung an den Folgestrang hybridisieren. Die Terminologie von HDAH-Varianten, die durch ortspezifische Mutagenese entwickelt wurden, ist wie folgt: Die in Form des Einbuchstabencodes zuerst genannte Aminosäure beschreibt die in HDAH-Wt ursprünglich vorkommende Aminosäure an der jeweiligen Position, welche durch zweitgenannte Aminosäure substituiert wurde. Am Beispiel der generierten HDAH-Variante C51S wurde Cystein an Aminosäureposition 51 durch Serin substituiert.

**Tab. 2: Mutagenese-Primer zur Entwicklung photoschaltbarer HDAH-Varianten**

Aminosäuresubstitution	Primerspezifikation	Oligonukleotidsequenz (5'- 3')
C51S	FP RP	ttcacgaactggtc <b>agc</b> gctccggtcagatcg cgatctgaccggaggc <b>gct</b> gaccagttcgtgaa
S20C	FP RP	tagataccggcaccgg <b>ctg</b> cctggccgctgcc ggcagcggccagg <b>gca</b> gccggtgccggtatcta
M30C	FP RP	aacctgacggcgcg <b>ctg</b> ccagcccatcagcc ggctgatgggct <b>ggc</b> agcgcgccgtcaggtt
D98C	FP RP	gatactgg <b>ctg</b> cggcatcaccatgatgggcaacg cgttgcccatcatggtgatgcc <b>gc</b> agccagtatc
M150C	FP RP	acaacgccgc <b>ctg</b> cggtttttgcatttc gaagatgcaaaaacc <b>gc</b> aggcggcgttgt
D211C	FP RP	atctgtgtttccgcc <b>ctg</b> ctccggctacagcacc ggtgctgtagccggag <b>gca</b> gggcgaaagcacagat
E340C	FP RP	atccttaccact <b>gct</b> tcctggcgggcatggg cccatgcccggcaggaa <b>gca</b> gtggtaaggat



Tab. 3: Mutagenese-Primer zur Untersuchung der *cis*-4-PAM Konfigurationsstabilisierung sowie des Photoschaltungsmechanismus an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche

Aminosäuresubstitution	Primerspezifikation	Oligonukleotidsequenz (5'- 3')
L21A	FP RP	taccggcaccggctgc <b>cg</b> ggccgctgccaacctgac gtcaggttggcagcgg <b>cg</b> tcgagccggtgccggtta
L21S	FP RP	taccggcaccggctgc <b>agc</b> ggccgctgccaacctgac gtcaggttggcagcgg <b>cg</b> tcgagccggtgccggtta
H35D	FP RP	atgcagcccatcagc <b>gat</b> cacctggcgcatcctg caggatgcgccaggt <b>gat</b> cgtgatgggtgcat
H35S	FP RP	atgcagcccatcagc <b>agc</b> cacctggcgcatcctg caggatgcgccaggt <b>ggt</b> gctgatgggtgcat
L37A	FP RP	agcccatcagccatcac <b>cg</b> ggcgcatcctgacacc ggtgtcaggatgcgc <b>cg</b> ctgtgatggctgatgggt
L37S	FP RP	agcccatcagccatcac <b>agc</b> ggcgcatcctgacacc ggtgtcaggatgcgc <b>gct</b> gtgatggctgatgggt
P274S	FP RP	atgccagcatgctggat <b>agc</b> ctggcgcgcatgatgg ccatcatgcgcgccag <b>g</b> ctatccagcatgctggcat
P274T	FP RP	atgccagcatgctggat <b>acc</b> ctggcgcgcatgatgg ccatcatgcgcgccag <b>ggt</b> atccagcatgctggcat
L275A	FP RP	atgctggatcc <b>ggc</b> ggcgcgcatgatgg ccatcatgcgcgc <b>cg</b> ccgatccagcat
L275S	FP RP	atgctggatcc <b>agc</b> ggcgcgcatgatgg ccatcatgcgcgc <b>gct</b> cggatccagcat

Tab. 4: Primer zur Restriktionsschnittstellenerweiterung von *NdeI* und *EcoRI*. Die *NdeI* Restriktionsschnittstelle wurde zusätzlich mit einem N-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-Tag ausgestattet.

Restriktionsschnittstellen	Primerspezifikation	Oligonukleotidsequenz (5'- 3')
<i>NdeI</i> + N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	FP	ata <b>catatg</b> catcaccatcaccatcac
<i>EcoRI</i>	RP	taga <b>aattct</b> cagcggatatccgcca

**Tab. 5: Sequenzierungsprimer.** Der pQE-70 FP hybridisiert an einen Bereich des *lac*-Operators und der pQE-70 RP an einen Bereich der Lambda ( $t_0$ ) Transkriptions-Terminationsregion. Die pQE-70 Primer (FP/RP) wurden für die qualitative Analyse des jeweiligen insertierten HDAH-Gens in den Vektor pQEB-MCS und die Primer für den T7 Promotor- sowie T7 Terminator-Bereich zur Analyse des in Vektor pET-22b(+) insertierten HDAH-Gens eingesetzt.

Sequenzierungsprimer	Primerspezifikation	Oligonukleotidsequenz (5'- 3')
pQE-70	FP	gcggataacaatttcacacag
	RP	ccgagcgttctgaacaaatcc
T7 Promotor	FP	taatacgactcactataggg
T7 Terminator	RP	gctagttattgctcagcgg

### 3. Methoden

#### 3.1. Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei 260 nm mit einem UV/Vis-Spektralphotometer (BioSpectrometer, Eppendorf) in einer Mikrolitermesszelle ( $\mu$ Cuvette G1.0, Eppendorf). Hierzu wurden 3  $\mu\text{l}$  der jeweiligen DNA-Probe in die Mikrolitermesszelle pipettiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Blindwert diente steriles Wasser. Der Reinheitsgrad der DNA-Proben wurde aus dem Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  ermittelt. Die DNA-Proben wurden als „rein“ bezeichnet, wenn der Reinheitsquotient ( $A_{260}/A_{280}$ ) mit einem Wert von  $\geq 1.8 - 2.0$  bestimmt wurde. Weist der Reinheitsquotient niedrigere Werte als 1.8 auf, deutet dies auf Verunreinigungen mit Proteinen oder anderen Verbindungen hin, welche bei 280 nm absorbieren. Ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  doppelstängiger DNA.

##### 3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Extraktion von Plasmid-DNA aus dem Überstand von lysierten *E. coli*-Zellen beruht auf dem Prinzip der alkalischen Extraktionsmethode.<sup>116</sup> Ergänzend zu dem Herstellerprotokoll wurde die an die Affinitätssäulen gebundene Plasmid-DNA, nach zweimaligen Waschen mit DNA-Waschpuffer, sukzessiv mit sterilem Wasser (1. Elution = 30  $\mu\text{l}$ , 2. Elution = 20  $\mu\text{l}$ ) eluiert und die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt (Kap. 3.1.1).

##### 3.1.3. DNA-Sequenzierung

Zur Verifikation der durchgeführten ortsspezifischen Mutationen oder Kontrolle von Ligationsprodukten wurde das in die Vektoren pQEB-MCS oder pET22(b)+ insertierte HDAH-Gen sequenziert. Die DNA-Sequenzierungen wurden von dem Sequenzierungsservice der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Sequenzierautomaten 3730 DNA-Analyzer (48 Kapillaren, 50 cm, Applied Biosystems) nach dem Protokoll „Cycle, Clean & Run (BigDye v3.1)“ durchgeführt. Die Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Sanger 2',3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphat (ddNTP) Sequenzierung<sup>117</sup> mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Die nach der Polymerase-Kettenreaktion

generierten und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden durch Kapillarelektrophorese separiert und die Nukleotidsequenz anhand des jeweiligen Fluoreszenzsignals analysiert. Die Sequenzierungsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 7  $\mu$ l vorbereitet, bestehend aus jeweils 150 - 300 ng Plasmid-DNA, 3.2 pmol des entsprechenden Sequenzierungsprimers (Tab. 5) und 10 mM TRIS-HCl Puffer (pH 8.5) oder H<sub>2</sub>O. Die Verifikation der DNA-Sequenzchromatogramme erfolgte mit der Software ChromasLite (Technelysium) und die Identifikation der durch ortspezifische Mutagenese generierten HDAH-Gen-Varianten anhand eines DNA-Sequenzabgleichs gegen das HDAH-Wt-Gen. Für den DNA-Sequenzabgleich wurde die Software SerialCloner (SerialBasics) verwendet.

---

### 3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

---

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung von DNA verwendet und dabei analytisch und präparative eingesetzt. Bei dieser Methode werden die DNA-Moleküle, aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrads, in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und durch Lichtanregung eines DNA-interkalierenden Farbstoffs (Midori Green Advance) visualisiert. Die analytische als auch präparative Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit 1.5 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung von 1.5 %igen Agarosegelen wurden 3 g Agarose in 200 ml 1x TAE-Puffer gelöst, die Suspension erhitzt und 50 ml der 1.5 %igen Agaroselösung zu einem Gel in einer Gießvorrichtung 30 min bei Raumtemperatur (RT) ausgehärtet. Die Durchführung der analytischen und präparativen Agarose-Gelelektrophorese unterschied sich in der DNA-Probenvorbereitung sowie dem Zusatz des DNA-interkalierenden Farbstoffs.

---

#### 3.1.4.1. Analytische Agarose-Gelelektrophorese

---

Bei der analytischen Agarose-Gelelektrophorese wurden 50 ml der 1.5 %igen Agaroselösung (Kap. 3.1.4) mit 10  $\mu$ l Midori Green Advance (1:10 Verdünnung der Stammlösung in H<sub>2</sub>O) versetzt und ein Kamm mit 20 Zinken eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. 6-fach DNA-Auftragspuffer gemischt und die Geltaschen mit je 10  $\mu$ l beladen. Als DNA-Größenstandard wurden 6  $\mu$ l des *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in 1-fach TAE-Puffer 1 h bei einer konstanten Spannung von 120 V und die Visualisierung der DNA-Fragmente durch UV-Lichtanregung (254 nm).

---

### 3.1.4.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

---

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde insbesondere für die Extraktion von größeren Mengen an DNA aus Agarosegelen verwendet. Die Herstellung von 1.5 %igen Agarosegelen (Kap. 3.1.4), ohne Zusatz von Midori Green Advance sowie die DNA-Vorbereitung und elektrophoretische Trennung (Kap. 3.1.4.1), erfolgte wie bereits beschrieben. Um größere DNA-Proben volumina bis zu 50  $\mu\text{l}$  separieren zu können, wurden von einem Gelkamm einzelne Zinken ( $\geq 3$ ) mit Klebeband zu größeren Geltaschen abgeklebt und in Nachbarschaft dazu jeweils ein Zinken (links und rechts) für eine saubere elektrophoretische Trennung freigelassen. Zum Ausschneiden der DNA aus dem Agarosegel wurde eine Musterprobe der zu untersuchenden DNA (5  $\mu\text{l}$  DNA-Probe + 1  $\mu\text{l}$  6-fach DNA-Auftragspuffer) sowie ein DNA-Größenstandard (Kap. 3.1.4.1) mitgeführt, deren Gelspuren nach elektrophoretischer Trennung mit einem Skalpell von dem restlichen Agarosegel abgetrennt wurden. Die Musterprobe und der DNA-Größenstandard wurden anschließend in einem wässrigen Midori Green Advance Färbebad (30 min, 50 ml 1-fach TAE-Puffer + 13  $\mu\text{l}$  Midori Green Advance Stammlösung) inkubiert, durch UV-Lichtanregung (254 nm) visualisiert und die gewünschte DNA mit einem Skalpell unter Ausschluss von UV-Licht isoliert. Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte wie unter Kap. 3.1.9 erläutert.

---

### 3.1.5. Polymerase-Kettenreaktion

---

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Fragmente *in vitro* enzymatisch amplifiziert werden.<sup>118</sup> Der PCR-Prozess gliedert sich in drei sukzessiv aufeinander folgende Schritte, welche in mehreren Zyklen, temperaturgesteuert wiederholt werden. In dem ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch **Denaturierung** (95 °C), d.h. Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementär zueinander gepaarten Nukleotiden, in zwei Einzelstränge überführt. Im Anschluss daran erfolgt die Anlagerung der Primer (FP/RP) an den jeweiligen DNA-Einzelstrang (**Hybridisierung**). Hierbei wird generell die Hybridisierungstemperatur auf 5-10 °C unterhalb der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primersequenzen eingestellt. Im letzten Schritt (**Elongation**) erfolgt die durch DNA-Polymerase katalysierte Polymerisation des komplementären DNA-Einzelstrangs (5'  $\rightarrow$  3'), beginnend ab dem 3'-OH Ende des jeweils hybridisierten Primers. Die Elongationstemperatur entspricht dem Temperaturoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase (72 °C). Zur Erzeugung ausreichender Mengen des gewünschten DNA-Amplifikats wurden die drei zuvor beschriebenen, aufeinanderfolgenden Schritte in Zyklen von 18 - 35 x wiederholt.

In dieser Arbeit wurde die PCR vor allem genutzt, um gezielte Bereiche des HDAH-Gens zu mutieren (**ortsspezifische Mutagenese**), das HDAH-Gen mit definierten Restriktionsschnittstellen zu erweitern sowie die Transformation vollständig ligierter HDAH-Gen/Vektor Konstrukte zu verifizieren (**Kolonie-PCR**).

### 3.1.5.1. Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde verwendet, um definierte Aminosäuren von HDAH gegen andere Aminosäuren auszutauschen und wurde in Anlehnung an das „*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* Protokoll“ (Stratagene) durchgeführt. Die für die Substitutionen ausgewählten DNA-Codons wurden für die Proteintranslation in *E. coli* gleichzeitig codonoptimiert: Alanin (GCG), Aspartat (GAT), Cystein (TGC), Serin (AGC) und Threonin (ACC).<sup>119</sup> Die erforderlichen Mutagenese-Primer (FP/RP, Tab. 2 & Tab. 3), wurden 100 % komplementär zueinander konzipiert und dabei das zu substituierende DNA-Codon relativ mittig platziert. Als Matrize wurden die Vektoren pQEB-MCS oder pET22(b)+ mit insertiertem HDAH-Gen verwendet. Zur Vermeidung zufällig auftretender Mutationen während der Elongation wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt, welche über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturlesefunktion) verfügt. Die aus *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL isolierte, parentale Plasmid-DNA, welche durch eine *E. coli* spezifische DNA Adenin Methylase (*dam*) methyliert vorliegt, wurde anschließend durch die Endonuklease *DpnI* hydrolysiert (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3').<sup>120</sup> Die Reaktionsansätze für die ortsspezifische Mutagenese des HDAH-Gens wurden wie in Tab. 6 vorbereitet und die Mutationen PCR-basierend (Tab. 7) durchgeführt.

Tab. 6: PCR-Reaktionsansatz für die ortsspezifische Mutagenese

Reagenzien	Reaktionsansatz
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
dNTP-Mix	200 µM
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	1x
<i>Pfu</i> -Polymerase	2.5 U
Plasmid-DNA	20 - 40 ng
FP	125 ng
RP	125 ng
H <sub>2</sub> O	ad. 50 µl

Bei manchen Amplifikationen war der Zusatz von DMSO (1 - 6 %) erforderlich, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu reduzieren.

Tab. 7: PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese

Programmabfolge	Temperatur / °C	Zeit / min	Zyklus / n
1) Initialdenaturierung	95	0.5 - 2	-
2) Denaturierung	95	0.5 - 1	} 18 - 25
3) Hybridisierung	65 - 70	0.5 - 1	
4) Elongation	72	1/kb + 5	

Die Elongationszeit wurde auf die jeweilige Vektorgröße angepasst (1 min/kb) und zusätzlich 5 Minuten addiert, um eine absolut vollständige Amplifikation der zu mutierenden Plasmid-DNA zu gewährleisten.

Die in den PCR-Reaktionsansätzen enthaltene parentale Plasmid-DNA wurde mittels *DpnI* hydrolysiert (10 Units (U), 37 °C, 1 h), die Amplifikation der mutierten Plasmide-DNA anhand bekannter Größe (pQEB-MCS/HDAH-His<sub>6</sub>-Tag = ~ 4.6 kb oder pET22(b)+/HDAH-His<sub>6</sub>-Tag = ~ 6.6 kb) mittels Agarose-Gelelektrophorese verifiziert (Kap. 3.1.4.1) und der *DpnI*-Amplifikat-Restriktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen transformiert (Kap. 3.1.10.2). Die mittels ortsspezifischer Mutagenese erzeugten HDAH-Varianten wurden durch Sequenzierung (Kap. 3.1.3) des HDAH-Gens bestätigt.

### 3.1.5.2. PCR-vermitteltes Anfügen von Restriktionsschnittstellen

Zur Steigerung der rekombinanten Proteinexpression der ortsspezifisch generierten HDAH-Varianten wurde das HDAH-Gen aus dem pQEB-MCS Vektor (T5 Promotor-/Transkriptionssystem) in den pET-22b(+) Vektor (T7 Promotor-/Transkriptionssystem) umkloniert. Mittels PCR wurde das HDAH-Gen um eine *NdeI* (5'-Ende) und eine *EcoRI* (3'-Ende) Restriktionsschnittstelle erweitert. Der ursprünglich N-terminal gelegene His<sub>6</sub>-Tag wurde durch den verwendeten *NdeI*-Primer erneut eingeführt und beibehalten. Die PCR-Reaktionsansätze wurden vorbereitet (Tab. 6) und die Amplifikation mit den entsprechenden Primern (Tab. 4) wie folgt durchgeführt: **Initialdenaturierung** (95 °C, 1 min), **Denaturierung** (95 °C, 1 min), **Hybridisierung** (65 °C, 1 min) und **Elongation** (72 °C, 2.5 min). Die

PCR erfolgte in Anlehnung an Tab. 7 in 18 Zyklen. Die generierten Amplifikate (ca. 1.1 kb) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese verifiziert (Kap. 3.1.4.1) und gereinigt (Kap. 3.1.6).

---

### 3.1.5.3. Kolonie-PCR

---

Zur Identifikation von *E. coli* XL1-Blue Einzelkolonien, die das ligierte pET-22b(+)/HDAH-Gen Konstrukt enthielten, wurde die Kolonie-PCR durchgeführt. Bei dieser PCR-Variante wurden auf LB-Amp-Platten kultivierte *E. coli*-Einzelkolonien mit einer 10-100 µl Pipettenspitze selektiert, Anteile des Bakterienmaterials in den jeweiligen PCR-Ansatz überführt und gleichzeitig eine LB-Amp Rückstellplatte angeimpft und diese über Nacht (ü.N.) bei 37 °C inkubiert. Für die Verifikation von pET-22b(+) Vektoren, die über das insertierte HDAH-Gen verfügen, wurden für die Amplifikation des HDAH-Gens die für die Restriktionsschnittstellenerweiterung verwendeten Primer von *NdeI* und *EcoRI* verwendet (Tab. 4). Die Reaktionsansätze für die Kolonie-PCR wurden in Anlehnung an Tab. 6 auf ein Gesamtvolumen von 20 µl berechnet und statt *Pfu*-Polymerase die *DreamTaq* DNA-Polymerase eingesetzt. Als PCR-Programm wurde eine Modifikation des in Tab. 7 beschriebenen Programms verwendet: **Initialdenaturierung** (95 °C, 3 min), **Denaturierung** (95 °C, 30 s), **Hybridisierung** (65 °C, 1 min) und **Elongation** (72 °C, 2 min). Die PCR erfolgte in 35 Zyklen.

Die DNA-Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese geprüft (Kap. 3.1.4.1), Bakterienmaterial der entsprechenden Einzelkolonie von der Rückstellplatte in 5 ml LB-Amp-Medium kultiviert (150 rpm, 37 °C, ü.N.), eine Plasmidisolierung durchgeführt (Kap. 3.1.2) und das HDAH-Gen durch DNA-Sequenzierung (Kap. 3.1.3) verifiziert.

---

### 3.1.6. Reinigung von DNA-Amplifikaten

---

DNA-Amplifikate, welche für Restriktionsreaktionen eingesetzt wurden, wurden von überschüssigen Reagenzien aus PCR-Reaktionen mit dem *GenElute PCR Clean-Up Kit* nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich) gereinigt, in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O konzentriert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 3.1.1).

---

### 3.1.7. Restriktion von DNA

---

Für die spezifische Hydrolyse von DNA und DNA-Fragmenten wurden die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *EcoRI* eingesetzt, welche kohäsive Enden mit einem 5'-Überhang erzeugen. Vorbereitend auf die Ligation von dem pET-22b(+) Vektor und dem Restriktionsschnittstellen erweiterten HDAH-Gen



wurden zur Linearisierung von 2  $\mu\text{g}$  pET-22b(+) Vektor 40 U *Eco*RI und 80 U *Nde*I eingesetzt. Für die Hydrolyse der an das HDAH-Gen angefügten *Eco*RI und *Nde*I Restriktionssequenzen wurden 20-30 ng des aufgereinigten DNA-Amplifikats mit 10 U *Eco*RI und 20 U *Nde*I inkubiert. Die Restriktionsreaktionen wurden allgemein 1 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  in einem 1/10-Verhältnis des Hersteller empfohlenen Puffers und sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden abschließend hitzeinaktiviert (65 °C, 20 min), die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese verifiziert (Kap. 3.1.4.2) und der linearisierte pET-22b(+) Vektor (ca. 5.4 kb) sowie das hydrolysierte HDAH-Gen (ca. 1.1 kb) aus dem Agarosegel extrahiert (Kap. 3.1.9). Die DNA-Konzentration der geextrahierten Proben wurde photometrisch bestimmt (Kap. 3.1.1).

---

### 3.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten

---

Für eine kovalente und enzymgesteuerte Verknüpfung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung, zwischen einer benachbart gelegenen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxylgruppe, wurde die T4 DNA-Ligase eingesetzt. Die Ligation von kohäsiven 5'-Überhang-Enden des linearisierten pET-22b(+) Vektors und HDAH-Gens erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific). Für die Ligationsreaktion wurde das restriktierte HDAH-Gen in einem 5-fach molaren Verhältnis ( $\sim 104$  ng) zu dem linearisierten pET22b(+) Vektor ( $\sim 100$  ng) eingesetzt und die Ligation mit einer Weiss Einheit der T4 DNA Ligase 30 min bei 22 °C in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Zur Verifikation der ligierten pET-22b(+)/HDAH-Gen Konstrukte ( $\sim 6.5$  kb) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Kap. 3.1.4.1), 5  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes in *E. Coli* XL1-Blue transformiert (Kap. 3.1.10.2) und eine Kolonie-PCR (Kap. 3.1.5.3) durchgeführt.

---

### 3.1.9. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

---

Zur Gewinnung von Restriktionsendonukleasen behandelten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, nach elektrophoretischer Auftrennung (Kap. 3.1.4.2), wurde das E.Z.N.A Gelextraktions Kit (Omega Bio-Tek) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die extrahierten DNA-Fragmente wurden in 50  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  konzentriert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 3.1.1).

---

### 3.1.10. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

---

Die Transformation beschreibt einen Vorgang, bei der freie, nicht-virale DNA in kompetente Bakterienzellen übertragen wird, wobei der genaue Vorgang allerdings unbekannt ist. Da *E. coli* über keine natürliche Kompetenz verfügt, muss diese entweder physikalisch (Elektroporation) oder

chemisch (z.B.  $\text{CaCl}_2$ -Methode) induziert werden. Es ist bekannt, dass die Behandlung von Bakterienzellen mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen die Aufnahme von DNA ermöglicht.<sup>121,122</sup> Hierbei wird angenommen, dass durch bivalente Kationen wie  $\text{CaCl}_2$  eine Anlagerung der negativ geladenen DNA an die Bakterienzelloberfläche begünstigt wird, welche anschließend durch Hitzeschock verursachte Porenbildung in die Bakterienzelle übertragen werden kann.

---

#### 3.1.10.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

---

Die chemische Kompetenz für die *E. coli* Stämme XL1-Blue und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurde durch die  $\text{CaCl}_2$ -Methode, in Anlehnung an Inoue *et al.*<sup>123</sup>, induziert.

250 ml TYM-Medium wurden mit 5 ml einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen innokuliert und die Bakterienzellen unter leichtem Schütteln (150 rpm) bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ), bei einer Wellenlänge von 600 nm, von 0.5 - 0.6 kultiviert. Die *E. Coli*-Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, anschließend unter der Sterilbank in sterile 50 ml Plastikreagiergefäße überführt und zentrifugiert (15 min, 4200 x g, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 50 ml eiskalten TFB1-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (15 min, 4200 x g, 4 °C) und abschließend in 15 ml eiskalten TFB2-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1.5 ml Plastikreagiergefäße aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

---

#### 3.1.10.2. Hitzeschock-Transformation

---

Die Transformation und Retransformation von Plasmid-DNA in  $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. Coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschock in Anlehnung an Inoue *et al.*<sup>123</sup> 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. Coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert und die Transformation 30 s in einem 42 °C warmen Wasserbad durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde anschließend 5 min auf Eis inkubiert, die Bakterienzellen in 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium (temperiert auf 42 °C) regeneriert (50 min, 1100 rpm, 37 °C) und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die LB-Amp-Platten wurden bei 37 °C ü.N. inkubiert. Bei erstmaliger Transformation von Ligationsprodukten oder von ortsspezifischer Mutagenese generierter Plasmid-DNA wurde nach Regeneration der Bakterienzellen der Transformationsansatz (~ 300  $\mu\text{l}$ ) durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g, RT) auf 100  $\mu\text{l}$  konzentriert und davon 50  $\mu\text{l}$  ausplattiert. Bei der Retransformation von Plasmid-DNA wurden direkt 50  $\mu\text{l}$  der regenerierten Bakterienzellen ausplattiert.

---

## 3.2. Biochemische Methoden

---

---

### 3.2.1. Kultivierung von *E. coli*

---

Wenn nicht anders erwähnt, wurde die Kultivierung von *E. coli* in sterilisiertem LB-Medium in Glas-Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen durchgeführt. Das LB-Medium wurde nach Herstellerangaben in vollentsalztem Wasser hergestellt und betrug stets die Hälfte des maximalen Füllvolumens des verwendeten Glas-Erlenmeyerkolbens. Die Sterilisation von Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren in feuchter Hitze bei 121 °C für 20 min. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden zuerst Vorkulturen hergestellt und diese anschließend zur Innokulation von Hauptkulturen verwendet. Bei den Vorkulturen wurden 50 - 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt, diese mit entsprechenden, tiefgefrorenen *E. coli*-Zellen (Kap. 3.2.2) innokuliert und kultiviert (19 h, 37 °C, 150 rpm). Für die weiterführende Kultivierung in einem höheren Volumenmaßstab wurde die OD<sub>600</sub> der Vorkulturen bestimmt und die Hauptkulturen (je 1l LB-Medium) mit einer OD<sub>600</sub> von 0.05 der jeweiligen Vorkultur innokuliert. Für die Induktion der Proteinexpression (Kap. 3.2.3) wurde die Kultivierung der *E. coli*-Zellen bis zu der jeweils erforderlichen OD<sub>600</sub> fortgeführt und mit IPTG eingeleitet.

---

### 3.2.2. Lagerung von *E. coli*-Kulturen

---

Für die Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden 20 %ige Glycerin-Lösungen hergestellt. Hierzu wurden 800 µl der entsprechenden *E. coli*-Vorkultur mit 200 µl sterilem Glycerin gemischt und die Lösung bei -80 °C gelagert.

---

### 3.2.3. Rekombinante Proteinexpression von HDAH-Varianten in *E. coli*

---

Der HDAH-Wt, sowie alle durch ortsspezifische Mutagenese (Kap. 3.1.5.1) generierten HDAH-Varianten, wurden rekombinant in *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL exprimiert. Die Kultivierung der beiden genannten *E. coli* Stämme erfolgte wie in Kap. 3.2.1 beschrieben. Bei Hauptkulturen von *E. coli* XL1-Blue wurde die Proteinexpression mittels 1 mM IPTG, bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6 - 0.8 und bei Hauptkulturen von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bei einer OD<sub>600</sub> von 2, eingeleitet. Die Kultivierung wurde für 16 h bei 37 °C (*E. coli* XL1-Blue) sowie RT (*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) weitergeführt. Abschließend wurden die *E. coli*-Zellen aus dem LB-Medium durch Zentrifugation (15 min, 17000 x g, 4°C) in zu 2/3 gefüllten Zentrifugenbechern (400 g inkl. Eigengewicht) abgetrennt und die Bakterienpellets auf Eis in jeweils 25 ml IMAC1-Puffer zu einer

homogenen Bakteriensuspension resuspendiert. Die daran anknüpfende Isolierung der exprimierten HDAH-Varianten aus *E. coli* ist im nachfolgenden Kap. 3.2.4 beschrieben.

---

### **3.2.4. Isolierung rekombinant exprimierter HDAH-Varianten aus *E. coli***

---

Zur Extraktion der rekombinant exprimierten HDAH-Varianten aus *E. coli* wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall aufgeschlossen und die HDAH-Varianten durch Präzipitation mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung angereichert.

---

#### **3.2.4.1. Zellaufschluss**

---

Der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte physikalisch durch Ultraschall (*Digital Sonifier Cell Disruptor* 250, Brandson Ultrasonics) in 50 ml Plastikreagiergefäßen. Die homogene Bakteriensuspension (Kap. 3.2.3) wurde unter Kühlung in einem Eis/Wasserbad 60 Ultraschallpulsen ausgesetzt (Zeit: 30 s, Pulsdauer: 0.5 s, Pulspause: 0.5 s, Amplitude: 20 %  $\pm$  40 W) und das Prozedere insgesamt sechs Mal wiederholt. Zwischen den einzelnen Ultraschallbehandlungen wurde die Bakteriensuspension jeweils 2 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 26000 x g, 4 °C) entfernt und das Bakterienzelllysate für die fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation eingesetzt.

---

#### **3.2.4.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation**

---

Die fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation (25 und 40 %) wurde in Bechergläsern durchgeführt und diente der Anreicherung von HDAH-Varianten aus dem Bakterienzelllysate sowie der simultanen Separation von HDAH-unspezifischen Proteinen. In dem ersten Schritt wurde dem Zelllysate über einen Zeitraum von 20 min bei RT und unter Rühren (300 rpm) portionsweise 144 g/l Ammoniumsulfat (25 %) hinzugegeben, die Lösung anschließend 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 26000 x g, 4 °C). Die HDAH-Varianten wurden aus dem Überstand in einem zweiten Schritt durch Zugabe von 93 g/l Ammoniumsulfat (40 %) präzipitiert und der zuvor beschriebene Schritt wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, das HDAH-Variant Pellet in insgesamt 60 ml IMAC1-Puffer resuspendiert und durch Filtration (0.45  $\mu$ M Porenfilter) für die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie vorbereitet.

### 3.2.4.3. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Der HDAH-Wt sowie alle generierten HDAH-Varianten wurden mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert und mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)<sup>124</sup> aufgereinigt. Bei dieser Methode werden Übergangsmetallionen (z.B. Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> oder Fe<sup>2+</sup>) durch ein chelatierendes Harz immobilisiert und Proteine über Histidine koordinativ an die immobilisierten Metallionen gebunden. Als Chromatographiesäule wurde eine C10/10-Glassäule verwendet (GE Healthcare), gefüllt mit 5 ml Iminodiessigsäure modifizierter Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare). Die IMAC wurde vollautomatisiert mit dem Flüssigkeitschromatographiesystem ÄKTAPrim Plus (GE Healthcare) mit immobilisierten Zn<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt. Das für die HDAH-Aufreinigung verwendete IMAC-Programm ist in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8: IMAC-Programm zur Aufreinigung von HDAH-Varianten.** F. Vol. = Fraktionsvolumen. I. Vol. = Injektionsvolumen. ZnCl<sub>2</sub> = 100 mM. EP1 = Elutionspuffer 1 (60 mM Imidazol). EP2-G = Elutionspuffer 2-Gradient (200 - 500 mM Imidazol). IMAC1 = 100 mM NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. EDTA = 50 mM. NaOH = 1 M. HCl = 10 mM. EtOH = 20 %.

Programm-Punkt (P)	Zeit / min	Flussrate / ml min <sup>-1</sup>	F. Vol. / ml	I. Vol. / ml	Lösungen
1	-40	2	0	20	H <sub>2</sub> O
2	-30	2	0	20	ZnCl <sub>2</sub>
3	-20	2	0	20	H <sub>2</sub> O
4	-10	2	0	20	EP1
5	0	1	10	90	Probeninjektion
6	90	1	5	20	EP1
7	-	1	0	0.1	EP2-G
8	110	1	2	19.9	EP2-G.
9	-	1	0	0.1	EP2-G.
10	130	2	5	19.9	IMAC1
11	140	2	0	20	EDTA
12	150	2	0	20	NaOH
13	160	2	0	20	H <sub>2</sub> O
14	170	2	0	20	HCl
15	180	2	0	20	H <sub>2</sub> O
16	190	2	0	20	EtOH
17	200	-	-	-	Programmende

Zu Beginn des IMAC-Programms wurde die 20 %ige EtOH Konservierungslösung durch Elution mit H<sub>2</sub>O (P1) entfernt, das Säulenmaterial mit einer ZnCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) äquilibriert (P2) und überschüssige Zn<sup>2+</sup>-Ionen durch weitere Elution mit H<sub>2</sub>O (P3) entfernt. Zur Steigerung der Aufreinigungseffizienz wurde das Zn<sup>2+</sup>-Ionen äquilibrierte Säulenmaterial mit Elutionspuffer 1 (EP1, 60

mM Imidazol) (P4) äquilibriert, um unspezifische Bindungen von Fremdproteinen an das Säulenmaterial zu reduzieren. Im Anschluss erfolgte die Probeninjektion von 60 ml HDAH-Lösung sowie zusätzlich eine Nachspülung mit 30 ml IMAC1-Puffer (P5). HDAH wurde anschließend von dem  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen immobilisierten Harz durch einen linearen Imidazolgradienten mittels Elutionspuffer 2 (EP2-G., 200 - 500 mM, P7-9) in jeweils 2 ml Fraktionen eluiert. Die Säulenmatrix wurde regeneriert (P10-15) und abschließend in 20 %igem EtOH (P16) konserviert. Ein beispielhaftes IMAC-Chromatogramm ist in dem Anhang zu finden (Abb. A. 7).

---

### 3.2.5. Ultrafiltration von HDAH-Lösungen

---

Die Konzentrierung von HDAH-Varianten erfolgte durch Ultrafiltration unter Verwendung von Einwegkonzentratoren (Vivaspin 2, Sartorius). Die Einwegkonzentratormembran bestand aus Polyethersulfon und besaß eine Trenngröße (MWCO) von 20 kDa. Die durch IMAC gewonnen HDAH-Fraktionen (je 2 ml, Kap. 3.2.4.3) wurden durch sukzessive Zentrifugation (10 min, 12000 x g, 4 °C) konzentriert, drei Mal mit je 2 ml Maleimid-Kopplungspuffer (MK-Puffer) gewaschen und das Proteinkonzentrat durch Inverszentrifugation (5 min, 5000 x g, 4 °C) in 1 ml MK-Puffer eluiert. Durch Nutzung der beschriebenen Einwegkonzentratoren konnte Imidazol abgetrennt und gleichzeitig die HDAH-Variant-Lösungen in MK-Puffer umgepuffert werden.

---

### 3.2.6. Protein-Konzentrationsbestimmung

---

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde der Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) verwendet. Der kolorimetrische BCA-Test kombiniert den Biuret-Test mit BCA als Detektionsreagenz, bei dem  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen in alkalisch wässrigem Milieu durch Proteine (Peptidbindungen, Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan) reduziert und  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen durch BCA komplexiert werden. Der dabei entstehende violette Farbkomplex wird photometrisch in seinem Absorptionsmaximum bei 562 nm detektiert.<sup>125,126</sup>

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der BCA-Test wurde nach Herstellerangaben in Form des Mikrotiterplatten Prozedere durchgeführt. Für die Kalkulation der Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade aus 2 mg/ml BSA-Standard (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welche durch eine serielle 1:2-Verdünnungsreihe (1000, 500, 250, 125, 62.5 und 0 µg/ml) hergestellt wurde. Zu 25 µl des BSA-Proteinstandards sowie der jeweiligen Proteinprobe wurden 200 µl des BCA Reagenz A/B-Gemisches (Mischungsverhältnis 50:1) pipettiert und der Ansatz 30 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert

---

(Thermomixer, Eppendorf). Die Absorption des BCA-Cu<sup>+</sup>-Komplexes wurde photometrisch bei 550 nm bestimmt (*Digiscan 340*, Asys Hitech) und die Proteinkonzentration anhand der BSA-Kalibriergerade durch lineare Regression berechnet (*MikroWin 2000*, Mikrotek). Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der kalkulierte Standardfehler des Mittelwerts (SEM) betrug maximal 5 %.

---

### 3.2.7. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

---

Mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische elektrophoretisch in einem diskontinuierlich, porösen Polyacrylamidgel (PA-Gel) anhand ihres Molekulargewichts getrennt. Durch die Anlagerung des anionischen Detergenz SDS an Proteine und der damit erzeugten einheitlichen negativen Überschussladung, können SDS-Protein-Komplexe in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts elektrophoretisch separiert werden. Die SDS-PAGE wurde zur Verifikation der rekombinant exprimierten HDAH-Varianten hinsichtlich der Reinheit sowie für den Nachweis der Modifikation mit Polyethylenglycol-Maleimid (PEG-M) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden die zu analysierenden Proteinproben in einem 1:1 Mischungsverhältnis mit 2-fach SDS-Auftragspuffer versetzt und die Tertiär- sowie Sekundärstruktur durch Hitzedenaturierung (95 °C, 5 min) aufgehoben. Die Proben wurden 2 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (30 s, 10000 x g, RT) und die Geltaschen mit jeweils 15 µl Probe beladen. Als Proteinstandard wurden 10 µl *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Separation von Proteinen wurde in Elektrophoresekammern (*Mini Protean 3 Cell*, Bio-Rad), in 10 und 12.5 %igen diskontinuierlichen PA-Gelen (Kap. 3.2.7.1) durchgeführt (1 h, 150 V, RT). Als Puffer wurde 1-fach Elektrophorespuffer eingesetzt. Die elektrophoretisch separierten Proteine wurden durch Coomassieblau-Färbung (Kap. 3.2.7.2) visualisiert und mittels Infrarot *Imager* (*Odyssey SA Imager*, LiCOR) bei 700 nm detektiert.

### 3.2.7.1. Herstellung diskontinuierlicher SDS-PA-Gele

Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an Laemmli<sup>127</sup> und wurde in Tab. 9 zusammengefasst. Für die chemische Gelpolymerisation wurde TEMED und APDS eingesetzt.

**Tab. 9: Ansatz zur Herstellung von diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen.** Die tabellarisch aufgeführten Reagenzien sind ausreichend für die Herstellung von insgesamt zwei diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen.

Reagenzien	Trenngel (12.5 %)	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamidlösung	5 ml	4 ml	660 $\mu$ l
1 M TRIS-HCl (pH 8.9)	4.5 ml	4.5 ml	-
1 M TRIS HCl (pH 6.8)	-	-	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (Milli-Q)	2.2 ml	3.2 ml	2.75 ml
20 % (w/v) SDS	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
12 % (w/v) APDS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Die diskontinuierlichen SDS-PA-Gele wurden mit einer Geldicke von 1 mm in vorab präparierte Glasvorrichtungen gegossen und das Trenngel mit 300  $\mu$ l Isopropanol, zu Glättung der Trenn-/Sammelgelübergangskante, beschichtet. Das Isopropanol wurde nach Polymerisation (30 min, RT) entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Gelkamm mit zehn Zinken wurde eingesetzt und das SDS-PA-Sammelgel über 30 min bei RT polymerisiert.

### 3.2.7.2. Coomassieblau-Färbung von Proteinen

Die Fixierung sowie Visualisierung der SDS-PAGE separierten Proteine erfolgte durch Coomassieblau-Färbung. Die SDS-PA-Gele wurden in Coomassieblau-Färbelösung (30 min, RT, leichtem Schütteln) inkubiert und anschließend drei Mal mit Coomassieblau-Entfärbelösung (30 min, RT, leichtem Schütteln) beschichtet. Die SDS-PA-Gele wurden abschließend in Wasser gelagert.

### 3.2.8. UV-A und Blaulichtbestrahlung

Für die Bestrahlung von Proben wurden UV-A und Blaulichthandlampen (Kap. 3.2.8.1) sowie eine Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe mit Bandpassfiltern (Kap. 3.2.8.2) eingesetzt. Die jeweils applizierten Bestrahlungsdosen wurden in Kap. 3.2.9 aufgeführt.



### 3.2.8.1. Handlampen

Für die *cis/trans*-Photoisomerisierung von 4-PAM und 4-PAM/HDAH-Konjugat Lösungen wurde eine UV-A Handlampe (6 W, 366 nm, Heraeus) sowie eine Blaulichthandlampe (1 W, LED, Osram) verwendet. Die Handlampen wurden an einem Metallstativ befestigt und die 4-PAM-Lösungen (0.2 - 1.2 ml) auf einem Deckglas, in einer Distanz zur jeweiligen Lampe von 6 cm, 25 min bei RT bestrahlt. Zur Vermeidung von Fremdlichteinstrahlung wurde eine Aluminium ummantelte Kartonröhre ( $\varnothing = 4.5$  cm, Länge = 5.5 cm) verwendet, welche zwischen Lampe und Deckglas fixiert wurde.

### 3.2.8.2. Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe

Für die Durchführung einer schnelleren, reversiblen Photoschaltung des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats in Lösung wurde eine 200 W DC Kurzlichtbogen Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe (*Superlite* SUV-DC-E, Lumatec) mit einem Fluid-Lichtleiter eingesetzt. Der Fluid-Lichtleiter sowie entsprechend nachgeschaltete Bandpassfilter (Kap. 3.2.9) wurden an einem Metallstativ befestigt. Die UV-A (1 min) bzw. Blaulichtbestrahlung (2 min) erfolgte bei RT in einer Distanz von 3 cm zur Probenflüssigkeitsoberfläche in einer schwarzen Quarzglas-Küvette (105.200-QS, Hellma Analytics). Als Bestrahlungsvolumen wurden 600 - 800  $\mu$ l der entsprechenden 4-PAM/HDAH-Konjugat Lösung eingesetzt.

### 3.2.9. Spektrale Strahldichtemessung von den verwendeten UV-A und Blaulichtlampen

Für eine genaue Angabe der durch UV-A sowie Blaulicht applizierten Bestrahlungsdosen ( $\text{mJ cm}^{-2}$ ) wurde die Spektrale Strahldichte ( $\text{W m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ ) der verwendeten UV-A Handlampe (6 W, 366 nm, Heraeus), der Blaulichthandlampe (1 W, LED, Osram) sowie das durch die 200 W DC Kurzlichtbogen Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe (*Superlite* SUV-DC-E, Lumatec), über einen Fluid-Lichtleiter (Serie 300,  $\varnothing = 5$  mm, Länge = 1.5 m; Lumatec) eingetragene Blaulicht (Weißlicht = 400 - 700 nm plus Bandpassfilter  $450 \pm 10$  nm) sowie UV-A Licht (320 - 400 nm plus Bandpassfilter  $340 \pm 10$  nm) gemessen. Die spektrale Strahldichtemessung erfolgte durch direkte Distanzmessung unter Verwendung eines Breitband Spektroradiometers (specbos 1211 UV, JETI Technische Instrumente). Die Distanz der UV-A Handlampe zu dem Spektroradiometer betrug 6 cm sowie die der Blaulichthandlampe und der Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe 30 cm. Die spektrale Strahldichte wurde, unter Berücksichtigung der zur Probenflüssigkeitsoberfläche eingehaltenen Distanz (cm) und der Bestrahlungszeit (s), in die insgesamt eingetragene Bestrahlungsdosis ( $\text{mJ cm}^{-2}$ ) pro Wellenlänge (nm) umgerechnet. Abschließend wurde die eingetragene Bestrahlungsdosis pro Wellenlänge über das

spezifische Wellenlängenspektrum integriert (Abb. A. 1 A-D). Darüber hinaus wurde über die gemessene spektrale Strahldichte die Stoffmenge der insgesamt eingetragenen Photonen pro Fläche kalkuliert ( $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ).

Für die UV-A Handlampe (6 W, 366 nm, Heraeus) konnte bei einer Distanz von 6 cm zur Probenflüssigkeitsoberfläche und einer Bestrahlungszeit von 25 min eine Gesamtbestrahlungsdosis (300 - 400 nm) von  $1.6 \text{ J cm}^{-2}$  sowie ein Gesamtphotoneneintrag von  $4.8 \mu\text{mol cm}^{-2}$  kalkuliert werden. Die Bestrahlungsdosenmaxima konnten bei 364 nm ( $43 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) sowie 354 nm ( $41 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) identifiziert werden (Abb. A. 1 A). Für die Blaulichthandlampe (1 W, LED, Osram) wurde bei einer Bestrahlungsdistanz von 6 cm zur Probenflüssigkeitsoberfläche und einer Bestrahlungszeit von 25 min eine Gesamtbestrahlungsdosis (422 - 515 nm) von  $40.3 \text{ J cm}^{-2}$  sowie ein Gesamtphotoneneintrag von  $157.5 \mu\text{mol cm}^{-2}$  berechnet. Der Höchstwert der Bestrahlungsdosis wurde bei 464 nm ( $1.5 \text{ J cm}^{-2}$ ) ermittelt (Abb. A. 1 B). In Bezug auf die Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe (200 W, *Superlite* SUV-DC-E, Lumatec), mit einem Abstand von der Fluid-Lichtleiteröffnung bzw. des dazwischen geschalteten Bandpassfilters ( $340 \pm 10 \text{ nm}$ ) von 3 cm zur Probenflüssigkeitsoberfläche und einer Belichtungszeit von 1 min, wurde bei Bestrahlung mit UV-A Licht (320 - 400 nm) eine Gesamtbestrahlungsdosis (318 - 375 nm) von  $0.5 \text{ J cm}^{-2}$  sowie ein Gesamtphotoneneintrag von  $1.4 \mu\text{mol cm}^{-2}$  berechnet. Das Bestrahlungsdosismaximum konnte hierbei bei 334 nm ( $47.6 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) sowie einem kleineren, jedoch distinkten Peakmaximum bei 365 nm ( $8 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) nachgewiesen werden (Abb. A. 1 C). Die Blaulichtbestrahlungsdosis der zuvor genannten Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe bei gleicher Distanz zur Probe (3 cm) und 2 min Bestrahlungszeit, ausgehend von dem Bandpassfilter  $450 \pm 10 \text{ nm}$  und einer applizierten Weißlichtbestrahlung (400 - 700 nm), belief sich bei einem Wellenlängenspektrum von 422 - 465 nm auf  $2.5 \text{ J cm}^{-2}$  sowie einem Gesamtphotoneneintrag von  $9.4 \mu\text{mol cm}^{-2}$ . Das Maximum der Bestrahlungsdosis konnte bei 437 nm ( $211 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) nachgewiesen werden (Abb. A. 1 D).

---

### 3.2.10. 4-PAM-Modifikation von HDAH-Cystein-Varianten

---

Für die Entwicklung photoschaltbarer HDAH-Varianten wurde das monofunktionale Azobenzol-Derivat 4-PAM verwendet. Dieses wurde selektiv über die Maleimidgruppe an oberflächenzugängliche HDAH-Cystein-Varianten gekoppelt. Die Konjugation erfolgte dabei über Michael-Addition unter Ausbildung einer Thioetherbindung. Für die Kopplungsreaktion wurde eine 5 mM 4-PAM/DMSO-Lösung verwendet, welche zur Steigerung der Wasserlöslichkeit in die polarere *cis*-Konfiguration durch UV-Bestrahlung (Kap. 3.2.8.1) überführt wurde. Die Modifikationsreaktion wurde in MK-Puffer und 8 % DMSO in einem 250  $\mu\text{l}$  Kopplungsansatz lichtgeschützt in braunen 1.5 ml Plastikreagiergefäßen

---

durchgeführt. Hierzu wurden 25 - 70  $\mu$ M der jeweiligen HDAH-Variante mit einem 4-fach molaren Überschuss an *cis*-4-PAM, in Bezug auf die eingesetzte Proteinkonzentration, inkubiert (2 h, 23 °C, 300 rpm). Nicht-reagierte Maleimidgruppen wurden durch Zugabe eines 110-fach molaren Überschuss, entsprechend der eingesetzten *cis*-4-PAM Konzentration, an DTT inaktiviert (30 min, 23 °C, 300 rpm) und der Kopplungsansatz zentrifugiert (15 min, 10000 x g, 23 °C). Der Überstand wurde mit MK-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und die 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate von überschüssigem inaktivierten 4-PAM mittels Einweggelfiltrationssäulen (illustra NAP-10 Säulen, GE Healthcare) gereinigt. Die Gelfiltrationssäulen wurden vor Verwendung mit 15 ml MK-Puffer äquilibriert, mit 1 ml des jeweiligen Kopplungsansatz beladen und die 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate in 1.5 ml MK-Puffer eluiert. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Test (Kap. 3.2.6).

---

### 3.2.11. PEG-M-Modifikation von HDAH-Cysteinen

---

Die PEG-M Modifikation wurde in erster Linie als qualitative Nachweismethode eingesetzt, um die Kopplung von oberflächenzugänglichen HDAH-Cysteinen zu identifizieren. PEG-M (5000 g/mol) wurde in einem 4- sowie 20-fach molaren Überschuss gegenüber der verwendeten HDAH-Konzentration eingesetzt. Das Kopplungsprozedere erfolgte in Anlehnung an die 4-PAM-Modifikation, allerdings ohne vorherige UV-A Bestrahlung und darauffolgende Gelfiltration (Kap. 3.2.10). Die PEG-M/HDAH-Konjugate wurden gegen MK-Puffer dialysiert (Kap. 3.2.12), die Proteinkonzentration der Konjugate mittels BCA-Test bestimmt (Kap. 3.2.6) und die PEG-M Kopplung anhand der Massenverschiebung zu höheren Molekulargewichten mittels SDS-PAGE (Kap. 3.2.7) nachgewiesen.

---

### 3.2.12. Dialyse von HDAH-Proben

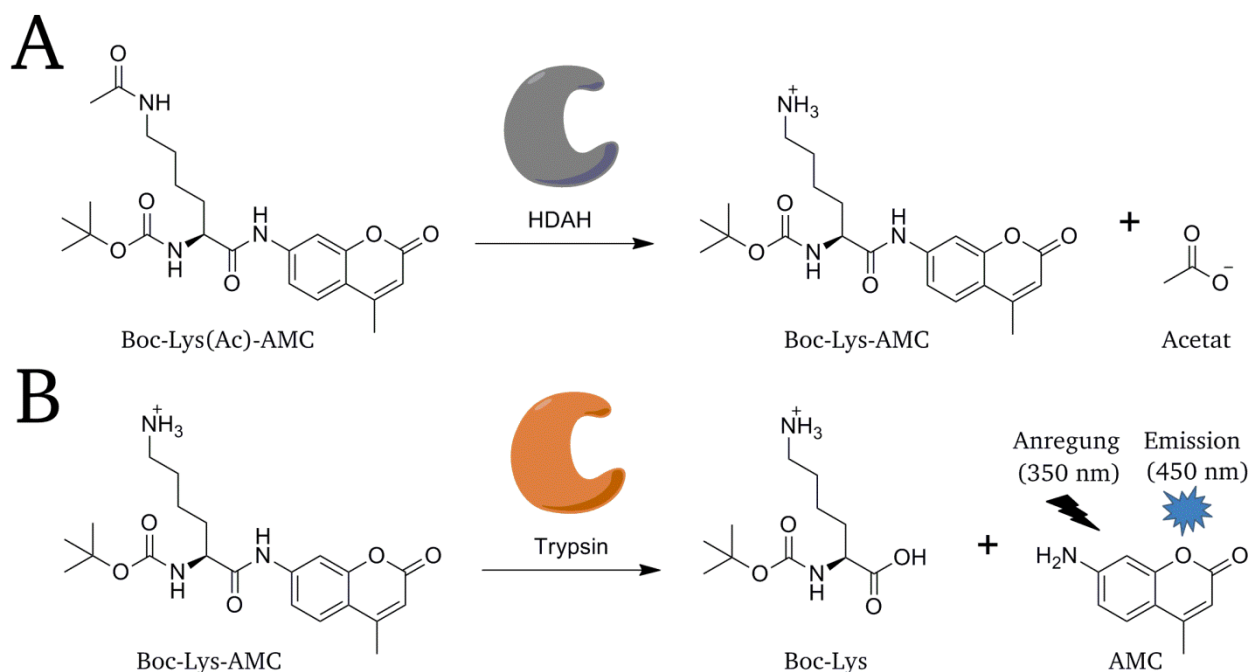
---

Die Dialyse wurde zur Entfernung überschüssiger Kopplungsreagenzien und für Puffersubstitutionen eingesetzt. Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche aus recycelter Cellulose mit einem MWCO von 12 - 14 kDa (Serva) verwendet. Die Dialyseschläuche wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und die HDAH-Proben in einem Proben zu Puffervolumenverhältnis von mindestens 1:200 bei 4 °C unter rühren (150 rpm) dialysiert. Der jeweilige Dialysepuffer wurde insgesamt drei Mal gewechselt (ein Mal nach 16 h und zwei Mal nach je 3 h).

### 3.2.13. HDAH-Aktivitätstest

Der HDAH-Aktivitätstest wurde eingesetzt, um Michaelis-Menten Kinetiken (Kap. 3.2.13.2) und mittlere inhibitorische Konzentrationen (Kap. 3.2.13.4) zu bestimmen sowie zur Überprüfung der Proteinexpression von HDAH-Varianten nach Zellaufschluss im Bakterienlysat (Kap. 3.2.13.1).

Die Enzymaktivität von HDAH wurde in Anlehnung an Wegener *et al.*<sup>108,109</sup> mit einem fluoreszenzbasierten Test gemessen. Das Testprinzip basiert auf zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Reaktionen (Abb. 16 A/B), bei dem das fluorogene Substrat „Boc-Lys(Ac)-AMC“ eingesetzt wird. Das Substrat besteht aus einem  $\epsilon$ -acetylierten Lysin „Lys(Ac)“, dessen N-Terminus durch eine *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) Gruppe geschützt und der C-Terminus durch einen AMC Rest flankiert ist. In der ersten Reaktion wird durch die HDAH katalysierte Deacetylierungsreaktion der  $\epsilon$ -acetylierte Lysinrest deacetyliert und Acetat freigesetzt (Abb. 16 A). In der zweiten Reaktion wird das deacetylierte Substrat (Boc-Lys-AMC) von Trypsin erkannt und AMC abgespalten. Die AMC-Freisetzung wird als Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit bei 450 nm (Anregung = 350 nm) detektiert (Abb. 16 B).



**Abb. 16: Zweistufiges Testprinzip des HDAH-Aktivitätstest.** (A) In dem ersten Reaktionsschritt erfolgt die Deacetylierung des  $\epsilon$ -acetylierten Lysinrests von Boc-Lys(Ac)-AMC unter Abspaltung von Acetat. (B) Im zweiten Reaktionsschritt wird das deacetylierte Substrat (Boc-Lys-AMC) durch Trypsin erkannt und das AMC-Molekül abgespalten. Die Detektion von AMC erfolgt durch Fluoreszenzintensitätsmessung ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ). Modifiziert nach Wegener *et al.*<sup>109</sup>

### 3.2.13.1. Generelle Durchführung

Der HDAH-Aktivitätstest wurde in einem Kavitätsgesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  in schwarzen 96-Well *half-area* Mikrotiterplatten (*flat bottom, polystyrene, medium-binding*; Greiner Bio-One, Frickenhausen) in Maleimid-Kopplung-Aktivitätspuffer (MKA-Puffer) durchgeführt. Der zuletzt genannte Puffer entspricht dem MK-Puffer mit Zusatz von 0.001 % Pluronic F68 und 0.005 % BSA. Die HDAH-Proben wurden auf 1  $\mu\text{M}$  mit MKA-Puffer verdünnt und je 10  $\mu\text{l}$  der verdünnten HDAH-Probe mit 70  $\mu\text{l}$  MKA-Puffer, 10  $\mu\text{l}$  Trypsin aus Rinderpankreas (5 mg/ml) und 10  $\mu\text{l}$  Boc-Lys(Ac)-AMC (500  $\mu\text{M}$ ) vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde 1 min bei 30 °C und 700 rpm in dem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (PHERAstar Plus, BMG Labtech) geschüttelt und die AMC-Fluoreszenzintensität bei 450 nm (Anregung = 350 nm) über 2 h bei 30 °C zu je 70 s Intervallen gemessen. Die HDAH-Aktivität wurde als Steigung aus einem linearen Bereich der gemessenen Fluoreszenzintensitätskinetik berechnet und entsprechend als relative Fluoreszenzintensität pro Sekunde ( $\text{RFU s}^{-1}$ ) dargestellt. Als obligatorische Kontaminationskontrolle der zur HDAH-Aktivitätsmessung verwendeten Reagenzien wurde der oben beschriebene Ansatz ohne Enzym hergestellt und mit 10  $\mu\text{l}$  MKA-Puffer auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Alle HDAH-Aktivitätstest wurden als Triplikate durchgeführt und die HDAH-Aktivität als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.2.13.2. Michaelis-Menten Kinetiken

Zur Untersuchung der potentiellen *cis/trans*-4-PAM-abhängigen Photoschaltung der HDAH-Aktivität wurden Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM modifizierten und unmodifizierten HDAH-Varianten durchgeführt. Die HDAH-Varianten wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese hergestellt (Kap. 3.1.5.1). Die Michaelis-Menten Parameter  $V_{\text{max}}$  und  $K_{\text{m}}$  wurden zur Verifizierung und Auswertung der Photoschaltung herangezogen.

Für die Durchführung der Michaelis-Menten Kinetiken wurden die zu untersuchenden HDAH-Varianten (30  $\mu\text{M}$ ) mit 4-PAM modifiziert (Kap. 3.2.10) und der konjugierte 4-PAM Rest einer 1  $\mu\text{M}$  4-PAM/HDAH-Konjugat Lösung (1.2 ml) in die *cis*- (UV-A-Bestrahlung) sowie *trans*-Konfiguration (Blaulichbestrahlung) überführt (Kap. 3.2.8.1). Als Referenzproben zu den 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten wurden die jeweiligen HDAH-Varianten den 4-PAM Kopplungsbedingungen ausgesetzt (Kap. 3.2.10) und als unmodifizierte, nichtbestrahlte Proben mitgeführt. Die Michaelis-Menten Parameter wurden bei gleichbleibender HDAH-Konzentration (Endkonzentration = 250 nM) in Abhängigkeit variierender Boc-Lys(Ac)-AMC Konzentration (1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 240  $\mu\text{M}$ , in MKA-Puffer gelöst) bestimmt. Die HDAH-Aktivitätsbestimmung erfolgte in Anlehnung an die

generelle Durchführung (Kap. 3.2.13.1), allerdings in einem Kavitätsgesamtvolumen von 120  $\mu\text{l}$ . Hierzu wurden 80  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Boc-Lys(Ac)-AMC Lösung und 30  $\mu\text{l}$  der 1  $\mu\text{M}$  4-PAM/HDAH-Konjugat oder der unmodifizierten HDAH-Variant-Lösung mit 10  $\mu\text{l}$  Trypsin aus Rinderpankreas (6 mg/ml) gemischt. Als Negativkontrolle wurden 80  $\mu\text{l}$  MKA-Puffer mit 10  $\mu\text{l}$  Trypsin (6 mg/ml) und 30  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Enzymprobe (1  $\mu\text{M}$ ) als Doppelbestimmung mitgeführt.

Die Michaelis-Menten Kinetiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism ausgewertet, indem die HDAH-Aktivität ( $\text{RFU s}^{-1}$ ) mittels einer AMC-Kalibriergeraden (Abb. A. 2) in die Substratumsatzgeschwindigkeit  $V$  ( $\text{nM s}^{-1}$ ) umgerechnet und gegen die eingesetzte Substratkonzentration (Boc-Lys(Ac)-AMC /  $\mu\text{M}$ ) aufgetragen wurde. Die Datenpunkte wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung analysiert ( $v_0 = V_{\max} * S / (K_m + S)$ ) und die maximale Geschwindigkeit ( $V_{\max} = \text{nM s}^{-1}$ ) extrapoliert. Das bedeutet, dass der angegebene  $V_{\max}$ -Wert in den meisten Fällen höher ist, als derjenige welcher in den Experimenten gemessen wurde.  $V_{\max}$  entspricht der maximal erreichbaren Substratumsatzgeschwindigkeit bei Substratsättigung des Enzyms. Der  $K_m$ -Wert wurde in  $\mu\text{M}$  angegeben und beschreibt die Substratkonzentration, bei der  $V_{\max}$  halbmaximal vorliegt.

Für eine robuste Ergebnisdarstellung der Michaelis-Menten Parameter wurden pro 96-well Platte, eine Michaelis-Menten Kinetik der jeweiligen unmodifizierten sowie der dazugehörigen 4-PAM/HDAH-Konjugate in *cis*- und *trans*-Konfiguration durchgeführt. Die verschiedenen verwendeten Substratkonzentrationen (1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 240  $\mu\text{M}$ ) wurden jeweils in Triplikaten pipettiert (intrinsische Kontrolle), die jeweiligen Geschwindigkeiten ( $\text{nM s}^{-1}$ ) gemittelt und diese als Datenpunkte für die Darstellung der Michaelis-Menten Kinetik sowie Berechnung der Michaelis-Menten Parameter eingesetzt. Pro getestete HDAH-Variante wurden also insgesamt drei 96-well Platten pipettiert, deren Enzymmaterial aus je drei voneinander unabhängigen Kopplungsansätzen hervorging. Die aus den drei 96-well Platten berechneten Michaelis-Menten Parameter wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben mit  $n = 3$ .

### 3.2.13.3. Berechnung der Photoschaltungseffizienz

Für die Ermittlung der Photoschaltungseffizienz von  $V_{\max}$ - oder  $K_m$ -Werten wurde das jeweils katalytisch aktivere ( $V_{\max}$ ) bzw. das Substrat affinere ( $K_m$ ) Isomer der untersuchten 4-PAM- oder der AMD/HDAH-Konjugate definiert (100 %) und die Photoschaltungseffizienz entsprechend zwischen der *cis*- und *trans*-Konfiguration prozentual berechnet. 4-PAM- oder AMD/HDAH-Konjugate wurden als  $V_{\max}$ - oder  $K_m$ -photoschaltbar gekennzeichnet, wenn sich zum einen die ermittelten Werte der *cis*- und *trans*-Konfiguration signifikant unterschieden, begründet durch eine einfache Varianzanalyse (ANOVA)

mit Bonferroni post-hoc Test und zum anderen, wenn eine Photoschaltungseffizienz für  $V_{\max}$ -Werte mit  $\geq 10\%$  und für  $K_m$ -Werte mit  $\geq 40\%$  bestimmt wurden. Die beiden zuletzt genannten Werte entsprechen dem jeweils ermittelten inter-experimentellen Standardfehler aus fünf verschiedenen unmodifizierten Enzymchargen von HDAH-M30C.

#### 3.2.13.4. IC<sub>50</sub>-Bestimmung

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) beschreibt die Konzentration einer Substanz, bei der bspw. eine enzymatische Reaktion zu 50 % gehemmt vorliegt. Der IC<sub>50</sub> wird allgemein verwendet, um die Potenz von inhibitorischen Substanzen zu vergleichen.

Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von der *cis*- und *trans*-Konfiguration von 4-PAM und den AMDs (**1a-e**) wurden Dosis-Wirkungskuren aufgenommen. Als HDAH-Variante wurde C51S eingesetzt, welche über kein oberflächenreaktives Cystein verfügt und demzufolge nicht durch Azobenzol-Maleimid-Derivate gekoppelt werden konnte. Für die IC<sub>50</sub>-Wertbestimmung des jeweiligen *cis*-Isomers wurden 5 mM 4-PAM oder AMD (**1a-e**) DMSO-Lösungen durch UV-A Bestrahlung in die *cis*-Konfiguration überführt (Kap. 3.2.8.1) und anschließend seriell in FB188-Puffer verdünnt. Die *trans*-Konfiguration wurde durch thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation generiert, indem die seriell verdünnten Proben 5 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert wurden. Die Endkonzentrationen der zum Test verwendeten Substanzen betrugen 100 nM HDAH-Variante C51S, 0.5 mg/ml Trypsin (Serva), 50 µM BocLys(Ac)-AMC sowie die der getesteten Azobenzol-Maleimid-Derivate, einer seriellen 1:4 Verdünnungsreihe, ausgehend von 300 µM. Die relative Enzymaktivität (RFU s<sup>-1</sup>) wurde wie beschrieben gemessen (Kap. 3.2.13.1) und in Abhängigkeit der jeweiligen applizierten Inhibitorkonzentration prozentual auf die Aktivität der mitgeführten Positivkontrolle normiert. Die Positivkontrolle entsprach einem Reaktionsansatz von HDAH-C51S ohne Inhibitor Zusatz (100 % Aktivität). Die jeweils normierten Werte wurden gegen die logarithmierte Inhibitorkonzentration aufgetragen und die Dosis-Wirkungskurven mittels eines drei-Parameter Dosis-Wirkungsmodells analysiert (GraphPad Prism). Die Dosis-Wirkungskurven wurden als unabhängige Dreifachbestimmung durchgeführt und die IC<sub>50</sub>-Werte als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die lediglich der Reagenzienüberprüfung (FB188-Puffer, Trypsin und BocLys(Ac)-AMC) auf mögliche Enzymkontamination diene. Zur Identifizierung des tatsächlich vorliegenden inhibitorischen Potentials von 4-PAM und AMDs (**1a-e**) auf die HDAH-Aktivität wurden Dosis-Wirkungskurven von DMSO (Dreifachbestimmung) am Beispiel von HDAH-Wt durchgeführt. Um die inhibitorische Potenz der Azobenzol-Maleimid-Derivate einordnen zu können, wurde der IC<sub>50</sub> eines bekannten HDAC- und HDAH-Inhibitors, SAHA, bezugnehmend auf HDAH-Wt bestimmt. Die Dosis-Wirkungskurve von SAHA wurde als Einfachbestimmung unter den oben



aufgeführten Testbedingungen durchgeführt und die Dosis-Wirkungskurve ebenfalls mit einem drei-Parameter-Modell (GraphPad Prism) analysiert.

### 3.2.14. CD-Spektroskopie

Mittels der Circular dichroismus (CD) Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen untersucht und der Anteil an Sekundärelementen ( $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Random coils) abgeschätzt werden. Als Chromophor dient die Peptidbindung, welche im fernen UV ( $\lambda = 175 - 250$  nm) angeregt wird. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Proteinproben mit rechts- und links zirkular polarisiertem Licht bestrahlt und die Absorptionsdifferenz in Abhängigkeit der Wellenlänge bestimmt. Die Sekundärstrukturelemente können anhand ihres charakteristischen CD-Spektrums identifiziert werden.  $\alpha$ -Helix Strukturen weisen insbesondere zwei Minima bei 222 nm und 208 nm sowie ein Maximum bei 192 nm auf. Charakteristisch für  $\beta$ -Faltblatt Strukturen sind CD-Spektren mit einem Minimum bei 217 nm sowie einem Maximum bei 200 nm. Random coil Strukturen besitzen ein charakteristisches Minimum bei 200 nm.<sup>128</sup>

Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurden 4-PAM/HDAH-Konjugate von S20C, M30C und Wt hergestellt (Kap. 3.2.10) und die jeweils unmodifizierten HDAH-Varianten gegen 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 7.2) dialysiert (Kap. 3.2.12, zweimal je 24 h). 1 ml einer 4-5  $\mu\text{M}$  Lösung des jeweiligen 4-PAM/HDAH-Konjugats wurden mit UV-A sowie Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). Die CD-Spektren wurden mit dem Spectropolarimeter Jasco-J810 (Jasco), in einer Quarzglaszuvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm sowie bei 20 °C, in einem Wellenlängenbereich von 185-255 nm und einer Akkumulation von je 10 Spektren aufgenommen. Die Elliptizität ( $\theta$ ) in Milligrad (mdeg) wurde in die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ( $[\theta]_{\text{mrw}}$ ) nach der unten angegebenen Formel<sup>129</sup> umgerechnet und die Werte in Abhängigkeit der Wellenlänge angegeben ( $[\theta]_{\text{mrw}, \lambda}$ ).

$$[\theta]_{\text{mrw}, \lambda} = \frac{\theta \cdot M}{n \cdot 10 \cdot c \cdot d}$$

$M$	Molmasse Protein / $\text{g mol}^{-1}$
$n$	Anzahl der Aminosäuren - 1
$c$	Proteinkonzentration / $\text{g ml}^{-1}$
$d$	Schichtdicke / cm
$\theta$	gemessene Elliptizität / deg
$[\theta]_{\text{mrw}, \lambda}$	<i>mean residue ellipticity</i> , in Abhängigkeit der Wellenlänge ( $\lambda$ ) / $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$



---

### 3.2.15. UV/Vis-Spektroskopie

---

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde eingesetzt, um die Photoisomerisierung von 4-PAM in Lösung sowie nach Konjugation von 4-PAM oder AMDs (**1a-e**) an HDAH-Varianten zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde die Methode verwendet, um das molare Kopplungsverhältnis (DOL), welches der durchschnittlichen Anzahl kovalent gekoppelter 4-PAM oder AMD Moleküle in der *trans*-Konfiguration pro HDAH Molekül entspricht, zu quantifizieren und das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten von 4-PAM in Lösung sowie nach Konjugation an HDAH-Varianten zu untersuchen.

---

#### 3.2.15.1. Generelle Durchführung

---

UV/Vis-spektroskopische Analysen wurden mit dem Spektrophotometer Jasco-V630 (Jasco) durchgeführt. Die zu untersuchenden Probenlösungen (0.2 - 1 ml) wurden in schwarze Quarzglasküvetten (105.200-QS, Hellma Analytics) überführt und UV/Vis-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 200 - 600 nm, mit 200 nm  $\text{min}^{-1}$ , einer mittleren Signalsensitivität und bei 30 °C aufgenommen. Die Thermostatisierung der Messprobe erfolgte in einem Peltier-Element (Jasco ETC-717). Als Referenzprobe wurde das entsprechende Lösungsmittel eingesetzt.

---

#### 3.2.15.2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von *trans*-4-PAM

---

Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ;  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) von *trans*-4-PAM wurde nach Lambert-Beerschen Gesetz ( $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ;  $E$  = Extinktion,  $\epsilon$  = siehe oben,  $c$  = Konzentration (mol/L),  $d$  = Schichtdicke der Küvette in cm) anhand drei verschiedenen 4-PAM-Konzentrationen (25, 50 und 100  $\mu\text{M}$ ) zu je 1 ml, UV/Vis-spektroskopisch (Kap. 3.2.15.1) in MK-Puffer (mit 8 % DMSO-Zusatz) bei 30 °C ermittelt. Zur Erhaltung der *trans*-Konfiguration (annäherungsweise 100 %) wurden die Proben im Dunklen 2 h bei 80 °C inkubiert und anschließend zwei Tage im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

---

#### 3.2.15.3. Bestimmung von DOL-Werten

---

Zur Bestimmung des DOL-Werts, durchschnittliche Anzahl von 4-PAM-Molekülen pro HDAH-Molekül, wurden die zu untersuchenden HDAH-Varianten mit 4-PAM modifiziert (25  $\mu\text{M}$ , Kap. 3.2.10) und zusätzlich dazu die jeweils dazugehörigen unmodifizierten HDAH-Variant-Proben als Referenzen mitgeführt. Die unmodifizierten HDAH-Variant-Proben wurden gleichermaßen nach dem 4-PAM Kopplungsprozedere behandelt. Zur fast vollständigen Generierung der *trans*-Konfiguration von 4-PAM, konjugiert an HDAH wurde je 1 ml der jeweils unmodifizierten und 4-PAM modifizierten HDAH-

Variante auf die gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt, die verwendeten 1.5 ml Plastikreagiergefäße mit Parafilm abgedichtet, die Proben im Dunkeln bei 35 °C für 48 h inkubiert und abschließend UV/Vis-Spektren aufgenommen (Kap. 3.2.15.1). Die Konzentration von kovalent an HDAH-Varianten gekoppeltem *trans*-4-PAM wurde nach Lambert-Beerschen Gesetz, unter Verwendung des entsprechenden  $\epsilon$  (Tab. 11), im Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max}$ ) von 4-PAM kalkuliert. Für die Konzentrationsbestimmung von HDAH und HDAH-Varianten wurde der für HDAH-Wt ( $43890 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; 280 nm) prognostizierte  $\epsilon$  nach Pace *et al.*<sup>130</sup> verwendet. Um die Proteinkonzentration der jeweiligen HDAH-Variante genau berechnen zu können, wurde die  $A_{280}$  der 4-PAM/HDAH-Konjugate auf die  $A_{280}$  der jeweiligen unmodifizierten HDAH-Variante normiert. Die durch 4-PAM Modifikation verursachte Standardabweichung in Bezug auf die  $A_{280}$  wurde mit  $\pm 13 \%$  berechnet, welche sich in der Genauigkeit der DOL-Werte widerspiegelte.

---

#### 3.2.15.4. Messung von thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von 4-PAM und 4-PAM/HDAH-Konjugaten

---

Für die Messung von thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von 4-PAM selbst sowie nach Konjugation an HDAH-Varianten wurde ein UV/Vis-Spektrophotometer mit Dioden-Array Detektor (DAD) (Specord S 600, Analytik Jena) und einem 8-fach Probenwechsler verwendet. 70  $\mu\text{M}$  der jeweiligen HDAH-Variante wurden mit einem 4-fach molaren Überschuss an 4-PAM, gegenüber der eingesetzten Proteinkonzentration, modifiziert (Kap. 3.2.10) und 8  $\mu\text{M}$  Lösungen zu je 1 ml mit MK-Puffer hergestellt. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung unabhängig voneinander gekoppelt bzw. verdünnt und die Kinetikmessungen als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Vor jeder Messung wurde ein Anfangsspektrum aufgenommen, um die Photoisomerisierung in die *cis*-Konfiguration zu prüfen und anschließend 900  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Probe mit UV-A Licht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). 700  $\mu\text{l}$  der bestrahlten Probe wurden in eine doppelwandige Quarzglasküvette überführt, mit zwei Teflonstopfen abgedichtet und die Kinetikmessung nach 5 min gestartet. Die UV/Vis-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 230 - 600 nm, einer Integrationszeit von 50 - 70 ms und einem Spektrum-Akkumulationsintervall von 10, bis zu 70 h bei 30 °C im Dunkeln aufgenommen. Im Detail wurden für die Messung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation von 4-PAM in Lösung sowie konjugiert an HDAH-Wt (C51) die ersten 390 Spektren mit je 2 min und weitere 210 Spektren zu je 5 min aufgenommen. Bezüglich aller anderen 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate wurden die ersten 180 UV/Vis-Spektren zu je 2 min und die restlichen 420 Spektren zu je 10 min gemessen. Als Referenz wurde MK-Puffer gemessen.

Für die Auswertung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationkinetikdaten wurde  $\lambda_{\max}$  von 4-PAM in Lösung (355 nm) sowie in konjugierter Form an HDAH-Wt (355 nm), S20C (340 nm) und M30C (325 nm) bestimmt. Die bei  $\lambda_{\max}$  über die Zeit gemessenen Absorptionswerte wurden auf 307 nm (isosbestischer Punkt von 4-PAM, Abb. A. 3) normiert und die berechneten Verhältnisse gegen die entsprechende Messzeit in h aufgetragen. Die Datenpunkte wurden mittels einem Ein- und Zwei-Exponential Model (GraphPad Prism) analysiert und zusätzlich die dazugehörigen Residuen dargestellt. Die Halbwertszeiten wurden durch den Term  $\ln(2)/k$  berechnet, wobei  $k$  die Ratenkonstante ( $\text{h}^{-1}$ ) darstellt. Die berechneten Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  angegeben.

### 3.2.16. Molekulardynamik-Simulationen

Die Molekulardynamik (MD)-Simulationen wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Florian Müller-Plathe und Herrn Dr. Ganesh Balasubramanian (TU-Darmstadt, Theoretische Physikalische Chemie) durchgeführt. Die MD-Simulationen wurde genutzt, um die durch 4-PAM induzierte Photoschaltung der HDAH-Aktivität und den dabei vorliegenden Mechanismus näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurde die Methode zur Untersuchung der räumlichen Ausrichtung von 4-PAM auf der Proteinoberfläche sowie zur Identifizierung von potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophoben Interaktionen zwischen dem konjugierten Azobenzolrest von 4-PAM und den HDAH-Varianten S20C und M30C verwendet. Die durch MD-Simulationen kalkulierten Atom-Trajektorien ermöglichten zudem die räumliche Analyse und die Bestimmung spezifischer Distanzen zwischen dem aromatischen *para*-Kohlenstoffatom, des an HDAH-Varianten angekoppelten Azobenzolrests und dem katalytischen Zink-Ion im Aktivzentrum. Für die MD-Simulationen wurde die HDAH Röntgen-Kristallstruktur mit der PDB ID: **2VCG**<sup>101</sup>, Kette A verwendet. *In silico* wurden die Cystein-HDAH-Varianten S20C und M30C durch Substitution der jeweiligen Aminosäure mit Cystein generiert und 4-PAM über eine Thioetherbindung an genannte Cysteine angefügt. Die MD-Simulationen von 4-PAM/HDAH-S20C und M30 Konjugaten wurden jeweils für die *cis*- und *trans*-Konfiguration von angekoppeltem 4-PAM durchgeführt.

Zur Modellierung intermolekularer Wechselwirkungen von Protein-Atomen mit umgebenden Wassermolekülen wurde das „Assisted Model Building and Energy Refinement“ (AMBER)-Kraftfeld<sup>131</sup> mit weitreichenden Coulomb-Wechselwirkungen verwendet und durch Nutzung der *Particle-Mesh*-Ewald (PME) Methode<sup>132</sup> Effekte partieller Atomladungen beschrieben. Durch Verwendung des SETTLE-Algorithmus<sup>133</sup> wurden die Bindungen und Winkel jedes Wassermoleküls eingeschränkt. Die zur MD-Simulation verwendeten Proteinmoleküle wurden zuerst individuell in einer kubischen

Simulationszelle mit einer Kantenlänge von je 10 nm energieminiert und ladungsneutralisiert<sup>134</sup> in wässriger Umgebung durch Zusatz von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> Ionen, um einen pH-Wert von 7.2 zu erhalten (entspricht den experimentellen Bedingungen). Das Simulationssystem wurde bei einer Temperatur von 30 °C und einem Druck von 1.01 bar initiiert. Die MD-Simulationen wurde in drei Schritten ausgeführt: (1) Isotherm-isobar (NPT) Ensemble über 3 ns, zur Äquilibration des Systems auf die geeignete Dichte sowie zur Stabilisierung des Drucks; (2) Kanonisches (NVT) Ensemble über weitere 7 ns, zur Äquilibration der Temperatur auf das festgelegte Systemvolumen; (3) Produktionslauf unter Verwendung des NVT Ensemble über weitere 9 ns, zur Aufnahme der molekularen Trajektorien, welche für die Beschreibung der Proteindynamik analysiert wurden. Berendsen barostat<sup>135</sup> und Geschwindigkeit-Maßstabveränderungsmethoden<sup>136</sup> wurden eingesetzt, um jeweils den Systemdruck sowie die Temperatur zu beschränken. Alle Simulationen wurde in Zeitschritten von je 2 Femtosekunden ausgeführt. Die MD-Simulationen wurden mit dem Simulationsprogramm „Yet Another Scientific Artificial Reality Application“ (YASARA) durchgeführt und die berechneten Atom-Trajektorien mittels dem Programm „visual molecular dynamics“ (VMD) analysiert.

Für die VMD-Analyse wurden die von YASARA generierten Trajektorien in das xtc-Format umgewandelt und alle Analysen in einem Zeitfenster von 10 - 19 ns (bei stabilisierten Molekularbewegungen des Proteinrückgrads (RMSD-Werte); Abb. A. 4) durchgeführt. Wasserstoffbrückenbindungen wurden über 450 Simulationsbilder (zu je 20 ps Schritten) mit einer Donor- (NH) Akzeptor- (O) Distanz von 3.1 Å<sup>137</sup> und einer Winkelabgrenzung von 30° analysiert. Die Distanzmessung zwischen dem aromatischen *para*-Kohlenstoffatom der Phenylgruppe (des angekoppelten 4-PAM-Rests) und dem katalytischen Zink-Ion von HDAH wurde mittels der radialen Verteilungsfunktion ( $g(r)$ ), über 450 Simulationsbilder (zu je 20 ps Schritten), in Abständen von  $\Delta r = 0.1$  analysiert. Nicht-kovalente Interaktionen zwischen den Kohlenstoffatomen von angekoppeltem 4-PAM und Kohlenstoffatomen des Proteinrückgrads (C und C $\alpha$ ) sowie den entsprechenden Aminosäureresten wurden in einer Distanz von 4.4 Å<sup>137</sup> über 150 Simulationsbilder (zu je 60 ps Schritten) analysiert und prozentual angegeben. Die Identifikation von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen (*edge-to-face*) wurde durch zuvor genannte Auswertung, allerdings mit einer Distanz von 3.8 Å<sup>137</sup>, durchgeführt und der Interaktionswinkel mittels dem Programm Chimera berechnet. Die beteiligten Aminosäuren wurden in Abhängigkeit des Interaktionsgrades nummeriert und die höchste Interaktion mit 1 gekennzeichnet (Tab. A. 3, Tab. A. 4 & Tab. A. 5). Zum Verständnis der in den Tabellen aufgelisteten, kalkulierten C-C-Kontakte wurde die von dem VMD-Programm verwendete Spezifikation der C-Atome von 4-PAM sowie involvierter Aminosäuren in Abb. A. 5 dargestellt. Konformationsänderungen bezüglich der HDAH-S20C Kanaleintrittsfläche, welche durch Photoisomerisierung des angekoppelten 4-PAM-Rests hervorgerufen wurde, konnte mittels dem

serverbasierten Programm CASTp (*computed atlas of surface topography of proteins*) analysiert und die Werte in Å<sup>2</sup> angegeben werden.

---

### 3.2.17. Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

---

Die Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Dipl.-Ing. Sebastian Hörner (TU-Darmstadt, AK Kolmar, Biochemie) durchgeführt und dazu verwendet, um qualitativ die 4-PAM-Modifikation an Cysteinen von HDAH nachzuweisen. Es wurden 30 µM HDAH mit einem 4-fach molaren Überschuss an 4-PAM in einem 1 ml Kopplungsansatz modifiziert (Kap. 3.2.10). Als Referenzprobe wurde unmodifizierter HDAH-Wt verwendet, welche den 4-PAM Kopplungsbedingungen ausgesetzt wurde. 600 µl (~ 0.83 mg/ml) der Referenzprobe sowie der 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat Lösung wurden denaturiert (95 °C, 10 min) und die Proben 5 min auf Eis gekühlt. Die enzymatische Hydrolyse der zuvor genannten Proben erfolgte durch Zusatz von Trypsin (25 µl; 1 mg/ml, gelöst in MK-Puffer) in einem Trypsin zu HDAH-Wt Verhältnis von 1:20, bei 37 °C für 16 h. Eine initiale Denaturierung der Proben war vor Beginn der Trypsin katalysierten Hydrolyse erforderlich, um einen nahezu vollständigen Verdau zu gewährleisten und demzufolge die vorhergesagten Peptidfragmente massenspektrometrisch nachweisen zu können. Trypsin wurde anschließend hitzeinaktiviert (95 °C, 5 min) und die Proben bei 4 °C gelagert.

Die Massenspektrometrie (MS) wurde mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (Shimadzu LCMS-2020, Shimadzu) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) in dem positiven und negativen Ionenmodus durchgeführt. Die vorgeschaltete Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC ≙ LC) wurde mittels einer Jupiter C4 Säule (Jupiter 300 5 µm C4 300Å; 50 x 1 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) bei 20 °C und einer mobilen Phase von (A) 0.1 % Ameisensäure in Wasser (v/v) oder in (B) Acetonitril (v/v) durchgeführt. Die Säulenofentemperatur wurde bei 37 °C aufrechterhalten. Es wurden je 80 µg der Trypsin-hydrolysierten Proben injiziert (100 µl) und die Peptidfragmente mittels einem linearen Konzentrationsgradienten von 2 - 100 % B bei einer Flussrate von 0.2 ml/min über einen Zeitraum von 10 min eluiert. Die Elution von Peptidfragmenten wurde generell durch Absorptionsmessung bei 220 nm verfolgt und 4-PAM modifizierte Peptidfragmente bei 330 nm detektiert.

Zur Auswertung der Massenspektren wurde ein *in silico* durchgeführter tryptischer Verdau von HDAH-Wt (*accession number*: Q70I53, UniProt Knowledgebase) durchgeführt und die prognostizierten Peptidfragmente zur Analyse herangezogen. Der tryptische Verdau von HDAH-Wt wurde mit dem „Expert Protein Analysis System“ (ExPASy) Server (Schweizer Institut für Bioinformatik) basierten

Programm „*PeptideCutter*“ simuliert (Tab. A. 1). Der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag wurde dabei nicht berücksichtigt.

### 3.2.18. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

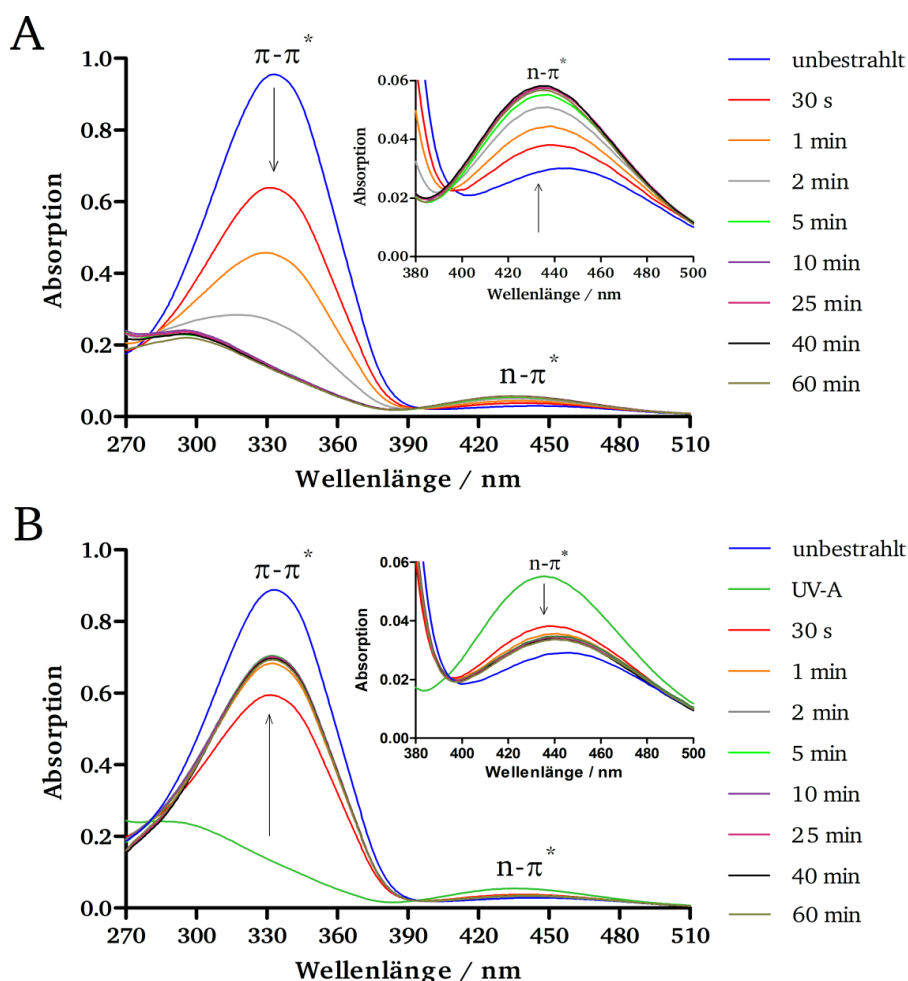
Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurde eingesetzt, um die photostationären Zustände von 4-PAM (Verhältnis von *cis*-zu-*trans*-Isomer in einer Lösung) in Abhängigkeit der Bestrahlung (UV-A und Blaulicht) und der Bestrahlungszeit zu untersuchen. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen NMR-Messungen wurden in Kooperation mit Dipl.-Ing. Christiane Wolff (TU Darmstadt, AK Thiele, Organische Chemie) durchgeführt, analysiert und ausgewertet. Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance III Spektrometer mit einer Betriebsfrequenz von 600.4 MHz aufgenommen. Das genannte NMR-Spektrometer war ausgestattet mit einem Triple-Resonanz Breitband (TBI) Probenkopf mit selektiver <sup>31</sup>P-Spule und einem z-Gradienten. Die Zuordnung der aromatischen Protonen von *cis*-4-PAM erfolgte mittels <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR und HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) sowie für *trans*-4-PAM mittels <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, COSY (*correlation spectroscopy*), HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) und HMBC. Da die Protonen H<sub>8</sub> und H<sub>9</sub>, trotz Anwendung von HMBC und HSQC, nicht eindeutig zugewiesen werden konnten (Abb. A. 6), wurde die Zuordnung anhand der chemischen Verschiebung vorgenommen (Tab. A. 2).

Für die Bestimmung der PSS von 4-PAM wurden 5 mM-Lösungen in DMSO-d<sub>6</sub> hergestellt und diese im Dunkeln 25 und 60 min mit UV-A sowie Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). 700 µl der bestrahlten Proben wurden in braune, lichtgeschützte NMR-Röhrchen (5 mm, Wilmad Labglass) überführt und eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR-Spektren mit je 8 Scans (NS), einer Relaxationszeit (D1) = 30 s, einer Pulslänge = 9.2 µs (π/2), Transmitterfrequenzverschiebung = 6.175 ppm, Spektrale Breite = 15 ppm, Punkte des FID *size of fid* = 65 536, bei 300 K gemessen. Zur Aufnahme der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurde die Software TopSpin 3.1 (Bruker) genutzt, unter Verwendung des Standard zg Pulsprogramms aus der Bruker Pulsbibliothek. Für jede Bestrahlungszeit wurde jeweils eine 4-PAM/DMSO-d<sub>6</sub>- Lösung verwendet. Die PSS wurden anhand der <sup>1</sup>H-NMR Signale der Protonen H<sub>3</sub> bzw. H<sub>3'</sub> quantifiziert. Die Integrationsfläche von *cis*-4-PAM wurde auf 6.921-6.834 ppm und die von *trans*-4PAM auf 7.970 - 7.882 ppm gesetzt. Das Integral von *trans*-4-PAM wurde auf 2.000 kalibriert und der *cis*- bzw. *trans*-Anteil über die jeweiligen Integrale prozentual berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Photoisomerisierung von 4-PAM in DMSO

In diesem Experiment wurde die *cis/trans*-Photoisomerisierung von 4-PAM in DMSO in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit (0 - 60 min) untersucht und beide Isomere UV/Vis-spektroskopisch nachgewiesen (Abb. 17). *cis*-4-PAM (UV-A-Bestrahlung) wurde durch simultane Absorptionsabnahme des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs sowie Steigerung der  $n$ - $\pi^*$  Absorptionsbande identifiziert (Abb. 17 A) und *trans*-4-PAM (Blaulichbestrahlung) anhand des gegensätzlichen Absorptionsverhaltens nachgewiesen (Abb. 17 B), ähnlich wie bei unsubstituiertem Azobenzol (Abb. 2). Die Bestrahlung (0 - 60 min) der 4-PAM/DMSO-Lösungen erfolgte mit einer UV-A sowie Blaulichthandlampe (Kap. 3.2.8.1).



**Abb. 17: Bestrahlungszeitabhängige Photoisomerisierung von 4-PAM in DMSO.** Die bestrahlungszeitabhängige Überführung von 4-PAM in die *cis*- und *trans*-Konfiguration wurde UV/Vis-spektroskopisch (Kap. 3.2.15.1) anhand von 40  $\mu$ M 4-PAM/DMSO-Lösungen verfolgt. (A) Generierung von *cis*-4-PAM durch UV-A-Bestrahlung. (B) Bildung von *trans*-4-PAM durch sequentielle Blaulichtbestrahlung, nach vorangegangener UV-A-Bestrahlung (25 min). Die Lichtbestrahlungen (0 - 60 min) erfolgten wie in Kap. 3.2.8.1 beschrieben, unbestrahlt = dunkel gelagerte Probe.



Für *trans*-4-PAM (Abb. 17 A/B, unbestrahlte Proben) konnte in DMSO ein starkes  $\pi$ - $\pi^*$  Absorptionsmaximum bei 333 nm sowie ein schwächeres  $n$ - $\pi^*$ -Absorptionsmaximum bei 435 nm identifiziert werden. Die Photoisomerisierung von 4-PAM in die *cis*-Konfiguration konnte bereits nach 10 min UV-A-Bestrahlung abgeschlossen werden (Abb. 17 A). Eine UV-A Bestrahlungszeit von 25, 40 und 60 min führte zu keiner weiteren Steigerung der  $n$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande (435 nm, Abb. 17 A). Hierbei wurde nicht nur die mit zunehmender UV-A-Bestrahlungszeit sukzessive Reduzierung des  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsmaximums (333 nm), sondern auch die simultane Absorptionssteigerung des  $n$ - $\pi^*$ -Übergangs ( $\lambda_{\text{max}} = 435$  nm) berücksichtigt. Diesbezüglich führte eine 10 minütige UV-A-Bestrahlung zu gleichen Absorptionswerten wie nach 25, 40 und 60 min. Die Rückisomerisierung von *cis*-4-PAM in das *trans*-Isomer (Abb. 17 B) erfolgte durch Blaulichtbestrahlung wesentlich schneller und war bereits nach 2 min abgeschlossen. Längere Blaulichtbestrahlungszeiten von  $\geq 2$  min führten weder zu einer Absorptionssteigerung der  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande, noch zu einer beobachteten Reduzierung des  $n$ - $\pi^*$ -Übergangs. Ergänzend dazu war eine vollständige Rückschaltung in den Ausgangszustand (unbestrahlte 4-PAM Probe) nicht mehr möglich (Abb. 17 B; vgl.  $\pi$ - $\pi^*$  und  $n$ - $\pi^*$ -Übergang). Für die beiden Übergänge ( $\pi$ - $\pi^*$  und  $n$ - $\pi^*$ ), welche miteinander korrelieren, konnten in Bezug auf gemessenen Absorptionswerte nach 2 - 60 min Blaulichtbestrahlung (Abb. 17 B) eine reduzierte Rückschaltung um ca. 21 % nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte anhand der unbestrahlten 4-PAM/DMSO Lösungen (Abb. 17 A/B) gezeigt werden, dass das *cis-trans*-Gleichgewicht hauptsächlich auf der Seite der *trans*-Konfiguration vorlag. Zur experimentellen Absicherung der photoinduzierten Gleichgewichtsverschiebung in Richtung der *cis*-Konfiguration wurde die nächst höhere getestete UV-A-Bestrahlungszeit von 25 min, anstelle von 10 min, bevorzugt. Aus praktischen Gründen wurde die Blaulichtbestrahlungszeit auf die der UV-A-Bestrahlungszeit angepasst (25 min).

---

#### 4.2. Quantifizierung photostationärer Zustände von 4-PAM

---

Die Quantifizierung der PSS von 4-PAM nach definierten Bestrahlungszeiten erfolgte mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie (Kap. 3.2.18). Zur Abgrenzung der *trans*- und *cis*-4-PAM Protonensignale wurde ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von *trans*-4-PAM aufgenommen, welches durch thermische Relaxation (80 °C, 1 h) erzeugt wurde (Abb. A. 15 A). Bezugnehmend auf die UV/Vis-spektroskopisch ermittelten und festgelegten Bestrahlungszeiten wurden die PSS von 4-PAM in DMSO insbesondere nach 25 min (Abb. A. 15 C/E) sowie zusätzlich nach 60 min (Abb. A. 15 B/D) UV-A bzw. Blaulichtbestrahlung bestimmt. Die ermittelten PSS von 4-PAM wurden prozentual in Tab. 10 zusammengefasst.

---



**Tab. 10: PSS von 4-PAM.** Zur Quantifizierung der PSS wurden die  $^1\text{H-NMR}$  Signale von den Protonen  $\text{H}_3$  bzw.  $\text{H}_3'$  der *cis*- (6.921-6.834 ppm) und *trans*-Konfiguration (7.970 - 7.882 ppm) von 4-PAM integriert (**Abb. A. 15 A-E**) und der *cis*- bzw. *trans*-Anteil über die jeweiligen Integrale prozentual berechnet. Das Integral des *trans*-Isomers wurde auf 2.000 normiert. Für die Messungen wurden 5 mM 4-PAM/DMSO-Lösungen eingesetzt. <sup>#</sup> = Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden wie in Kap. 3.2.18 beschrieben aufgenommen und in **Abb. A. 15 A-E** dargestellt. <sup>\*</sup> = Inkubation bei 80 °C für 1 h. 464 nm = Blaulicht, 364 nm = UV-A. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

$^1\text{H-NMR}$ - Spektren <sup>#</sup>	Bestrahlungszeit / min	Wellenlänge / nm	Integrale ( $\text{H}_3$ und $\text{H}_3'$ )		PSS von 4-PAM / %	
			<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
A*	-	-	2.000	0.006	99.7	0.3
B	60	464	2.000	0.689	74.4	24.7
C	25	464	2.000	0.655	75.3	24.7
D	60	364	2.000	16.881	10.6	89.4
E	25	364	2.000	2.302	46.5	53.5

Durch die thermische Relaxation von 4-PAM in  $\text{DMSO-d}_6$  konnte das chemische Gleichgewicht nahezu vollständig auf die Seite der *trans*-Konfiguration (99.7 %) verschoben werden (Tab. 10, A\*). Eine Erhöhung der Blaulichtbestrahlungszeit von 25 min auf 60 min führte zu keiner signifikanten Steigerung des *trans*-Isomeranteils von  $\geq 75$  % (Tab. 10, vgl. B/C). Durch UV-A-Bestrahlung (25 min) hingegen, konnte das Gleichgewicht des PSS leicht in Richtung der *cis*-Konfiguration (53.5 %) verschoben und durch längere Bestrahlungszeit (60 min) auf 89.4 % *cis*-Isomeranteil gesteigert werden (Tab. 10, vgl. D/E).

Die durch UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesene, unvollständige Rückisomerisierung von *trans*-4-PAM nach Blaulichtbestrahlung (ca. 21 %; Abb. 17 B, 2 - 60 min) konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt werden. Im Vergleich zur thermisch relaxierten Probe (99.7 % *trans*, Tab. 10 A\*) führte die Blaulichtbestrahlung (25 und 60 min) zu einer Abnahme des *trans*-Konfigurationsanteils um ca. 25 % (Tab. 10 B/C). Die Bestimmung des *cis*-Isomeranteils in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit war anhand der aufgenommenen UV/Vis-Spektren nicht möglich und konnte im Detail nur durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie quantifiziert werden. Obwohl für die in Abb. 17 A dargestellten UV/Vis-Spektren von 4-PAM in DMSO nach einer UV-A Bestrahlungszeit von 25 und 60 min kein Unterschied festgestellt werden konnte und bei beiden Spektren die  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande vollständig reduziert sowie keine weitere Steigerung des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs vorlag, führte eine 25 minütige UV-A-Bestrahlung, verglichen mit 60 min, zu einem 35.9 % reduzierten *cis*-Anteil (Tab. 10, vgl. D/E).

---

### 4.3. Identifizierung und Eliminierung oberflächenzugänglicher HDAH-Cysteine

---

Inhalte dieses Kapitels wurden publiziert, Korbus *et al.*<sup>16</sup>

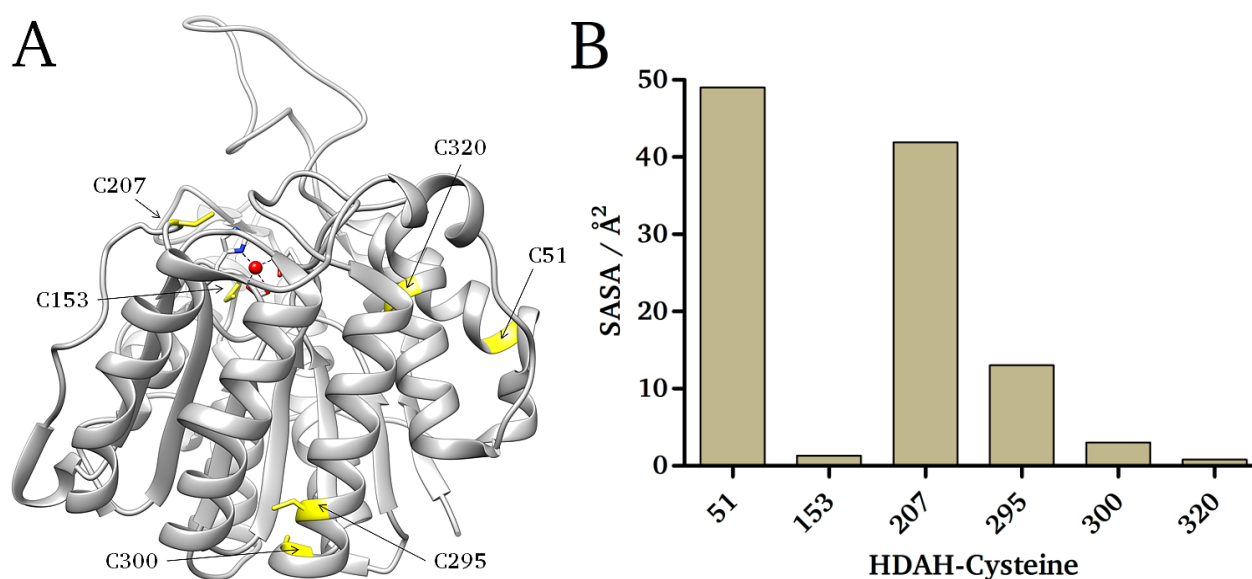
Für die Entwicklung einer reversibel photoschaltbaren HDAH, deren Enzymaktivität systematisch durch *cis/trans* Isomersierung eines kovalent angekoppelten Azobenzol-Derivats (4-PAM) geschaltet werden soll, war es von größter Bedeutung, dass nur ein einziges und definiertes lösungsmittelzugängliches Cystein auf der HDAH-Oberfläche als 4-PAM-Modifikationsstelle zur Verfügung stand. Nur unter dieser Voraussetzung konnte eine zielgerichtete Analyse potentiell möglicher, photoschaltbarer HDAH-Varianten garantiert werden. Um die Proteinstruktur von HDAH durch ortsspezifische Mutagenese so gering wie möglich zu beeinflussen, wurden die sechs existenten Cysteine von HDAH (C51, C153, C207, C295, C300 und C320) auf potentielle 4-PAM-Modifizierbarkeit geprüft. Hierzu wurde im Vorfeld eine theoretische Evaluierung und die Lokalisation möglicher oberflächenzugänglicher Cysteine durch Kalkulation der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA) durchgeführt (Kap. 4.3.1) und anschließend experimentell die DOL-Werte bestimmt (Kap. 4.3.2.2). Die für die 4-PAM Modifikation zur Verfügung stehenden HDAH-Cysteine wurden durch massenspektrometrische Analyse (LC-ESI-MS) identifiziert (Kap. 4.3.3), durch ortsspezifisch Mutagenese eliminiert und abschließend durch PEG-M Modifikation verifiziert (Kap. 4.3.4).

---

#### 4.3.1. Vorhersage von oberflächenexponierten HDAH-Cysteinen

---

Die theoretische Abschätzung potentieller, oberflächenzugänglicher Cysteinreste von HDAH erfolgte durch SASA-Kalkulation. Für die Berechnung wurde die Röntgenkristallstruktur von HDAH (PDB ID: 2VCG, Kette A)<sup>101</sup> verwendet und SASA-Werte für die sechs existenten HDAH-Cysteine (C51, C153, C207, C295, C300 und C320) berechnet. Zur Simulierung eines wässrigen Milieus wurde der approximative Prüfungsradius eines Wassermoleküls mit  $1.4 \text{ \AA}^{138}$  herangezogen und die SASA-Kalkulation mit dem Programm Chimera ausgeführt. Die Lokalisation der sechs HDAH-Cysteine sowie deren ermittelten SASA-Werte ( $\text{\AA}^2$ ) wurden in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18: Kalkulierte SASA-Werte für HDAH-Cysteine.** (A) Lokalisation der sechs existenten HDAH-Cysteine (C51, C153, C207, C295, C300 und C320, in gelb hervorgehoben). Das Aktivzentrum ist durch das katalytische Zink-Ion ( $\text{Zn}^{2+}$ , rote Kugel) dargestellt, welches durch ein Histidin (H182) und zwei Aspartatreste (D180 und D268) koordinativ gebunden wird. (B) Kalkulierte SASA-Werte ( $\text{\AA}^2$ ) der sechs HDAH-Cysteine mit dem approximativen Prüfungsradius eines Wassermoleküls mit  $1.4 \text{ \AA}$ .<sup>138</sup>

Anhand der kalkulierten SASA-Werte konnten insbesondere zwei mögliche oberflächenzugängliche HDAH-Cysteine (C51 und C207) vorhergesagt werden für die, im Vergleich zu den anderen vier Cysteinen, wesentlich höhere SASA-Werte ermittelt werden konnten (Abb. 18 A/B). Für das HDAH-Cystein 51 wurde der größte SASA-Wert mit  $49.0 \text{ \AA}^2$  berechnet, gefolgt von Cystein 207 ( $41.9 \text{ \AA}^2$ ) und 295 ( $13.0 \text{ \AA}^2$ ). Die Cysteine 300 ( $3.0 \text{ \AA}^2$ ), 153 ( $1.3 \text{ \AA}^2$ ) und 320 ( $0.8 \text{ \AA}^2$ ) wiesen wesentlich geringere SASA-Werte auf und wurden aufgrund der stark verringerten Oberflächenzugänglichkeit als intrinsisch gelegene Cysteine eingeordnet (Abb. 18 A/B). Diese Annahme konnte für C153 bestätigt werden, da dieser Aminosäurerest in der Bildung des Aktivkanals involviert ist.<sup>99</sup>

#### 4.3.2. Quantifizierung 4-PAM modifizierbarer HDAH-Cysteine

Für die experimentelle Quantifizierung von potentiell lösungsmittelzugänglichen HDAH-Cysteinen in MK-Puffer wurde die DOL-Wertbestimmung von 4-PAM modifiziertem HDAH-Wt eingesetzt. Zur Berechnung der an HDAH-Wt gekoppelten 4-PAM Moleküle nach Lambert-Beerschen-Gesetz wurde der molare Extinktionskoeffizient von *trans*-4-PAM in MK-Puffer bestimmt (Kap. 4.3.2.1) und die optimalen Kopplungsparameter für die 4-PAM-Modifikation von HDAH-Wt (Kap. 4.3.2.2) untersucht.

#### 4.3.2.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von *trans*-4-PAM

Aufgrund der Tatsache, dass die *trans*-Konfiguration von 4-PAM dem thermodynamisch stabileren Isomer entspricht und demnach in Lösungen favorisiert vorliegt, wie bereits bei unbestrahlten 4-PAM/DMSO Lösungen gezeigt (Kap. 4.1, Abb. 17 A/B), wurde für die Quantifizierung von 4-PAM Konzentrationen in MK-Puffer der  $\epsilon$ -Wert von *trans*-4-PAM bestimmt (Kap. 3.2.15.2) und dieser in Abhängigkeit selektierter Wellenlängen in Tab. 11 zusammengefasst.

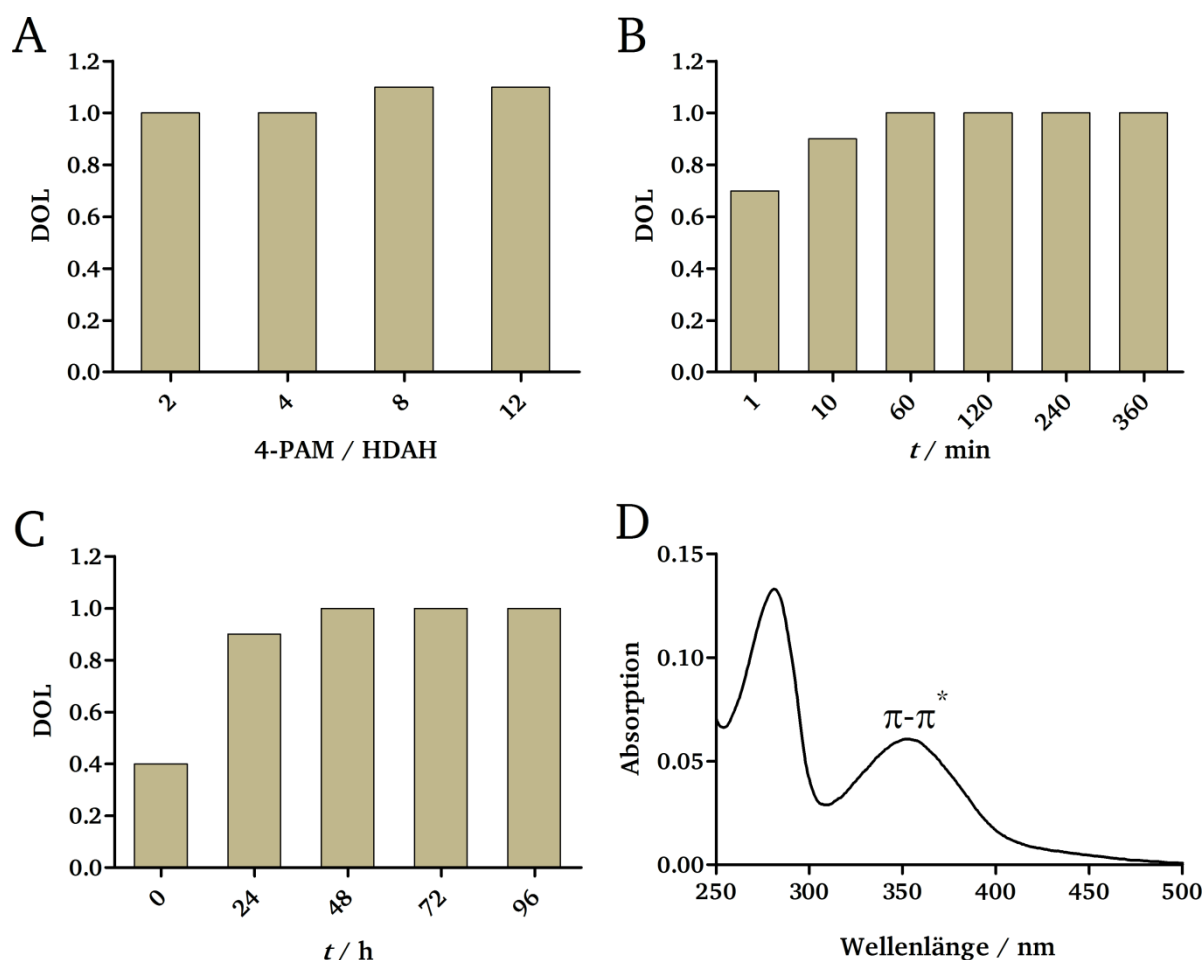
**Tab. 11:  $\epsilon$  von *trans*-4-PAM.**  $\epsilon = \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .  $\epsilon$  wurde UV/Vis-spektroskopisch (Kap. 3.2.15.2) in MK-Puffer mit 8 % DMSO bei 30 °C bestimmt. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 3$ , aus drei verschiedenen 4-PAM Konzentrationen (25, 50 und 100  $\mu\text{M}$ ).

$\epsilon$ (360 nm)	$\epsilon$ (350 nm)	$\epsilon$ (340 nm)	$\epsilon$ (335 nm)	$\epsilon$ (330 nm)
$20894 \pm 141$	$21344 \pm 155$	$19309 \pm 152$	$17662 \pm 118$	$15700 \pm 107$

Das Absorptionsmaximum von *trans*-4-PAM konnte in MK-Puffer bei 353 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande) bestimmt werden. Im Vergleich zu dem in DMSO aufgenommenen UV/Vis-Spektrum von *trans*-4-PAM wurde im wässrigen MK-Puffer eine leichte bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs beobachtet (positive Solvatochromie). Hierbei wurde das in DMSO gemessene  $\lambda_{\text{max}} \pi$ - $\pi^*$  (333 nm) von 4-PAM (Abb. 18 A) um 20 nm auf 353 nm zu längeren Anregungswellenlängen und damit zu niedrigeren Anregungsenergien verschoben.

#### 4.3.2.2. 4-PAM-Modifikation von HDAH-Cysteinen

Zur Identifikation der optimalen 4-PAM-Modifikationsbedingungen wurde HDAH-Wt mit verschiedenen molaren Überschüssen an 4-PAM (2, 4, 8 und 12-fach) gegenüber der eingesetzten Proteinkonzentration gekoppelt (Abb. 19 A) und die Modifikationsdauer (1 - 360 min) untersucht (Abb. 19 B). Speziell für die DOL-Wertbestimmung wurden die 4-PAM/HDAH-Konjugate im Dunkeln bei 35 °C für 48 h inkubiert und die DOL-Werte anschließend UV/Vis-spektroskopisch bestimmt (Kap. 3.2.15.1). Der zeitabhängige Einfluss auf die DOL-Wertbestimmung des 4-PAM/HDAH-Konjugats, bezüglich der *cis*-zu-*trans* Relaxation des angekoppelten 4-PAM Rests bei 35 °C (0 - 96 h), ist in Abb. 19 C dargestellt. Das UV/Vis-Spektrum eines 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats, welches bei 35 °C für 48 h im Dunkeln inkubiert wurde, ist in Abb. 19 D gezeigt.



**Abb. 19: 4-PAM Modifikation von HDAH-Wt.** (A) Konzentrationsabhängige Modifikation von HDAH-Wt durch 4-PAM, im molaren Überschuss, bei einer Kopplungsdauer von 2 h. (B) Zeitabhängige Modifikation von HDAH-Wt mit einem 4-fach molaren Überschuss an 4-PAM. (C) Zeitabhängiger Einfluss der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation bei 35 °C auf die DOL-Wertbestimmung des 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats unter Verwendung eines 4-fach molaren 4-PAM Überschusses. (D) UV/Vis-Spektrum eines 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats, inkubiert bei 35 °C für 48 h. Das 4-PAM Modifikationsprozedere sowie die DOL-Wertbestimmung erfolgten, unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Parameter, wie beschrieben (Kap. 3.2.15.3). Für die Kalkulation des DOL-Werts wurde der für *trans*-4-PAM bestimmte  $\epsilon$  von  $21344 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (350 nm; Tab. 11) eingesetzt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Die Modifikation von HDAH mit unterschiedlichen molaren Überschüssen an 4-PAM zeigte, dass nur ein HDAH-Cystein durch 4-PAM modifiziert wurde (DOL-Wert bei 1, Abb. 19 A). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die 4-PAM Kopplungsreaktion vollständig nach 1 h bei Verwendung eines 4-fach molaren 4-PAM Überschusses abgeschlossen werden konnte (Abb. 19 B). Für eine akkurate Bestimmung des DOL-Werts war es erforderlich, dass der an HDAH-Wt kovalent gekoppelte 4-PAM-Rest in der *trans*-Konfiguration vorlag, welches thermodynamisch bei 35 °C nach 48 h erreicht wurde (Abb. 19 C). Eine direkte Bestimmung des DOL-Werts nach Abschluss der 4-PAM Modifikation von HDAH-Wt (Abb. 19 C, 0 h) führte zu einem 2.5-fach erniedrigten DOL-Wert und machte den

Inkubationsschritt essentiell für repräsentative DOL-Wertbestimmungen. Das Absorptionsmaximum von 4-PAM, gekoppelt an HDAH-Wt, konnte in MK-Puffer bei 350 nm ( $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande) bestimmt werden (Abb. 19 D), welches ebenfalls für freies 4-PAM nachgewiesen wurde (Kap. 4.3.2.1). Ein Einfluss auf das Absorptionsverhalten von 4-PAM, bedingt durch die Biokonjugation an HDAH-, konnte demnach ausgeschlossen werden.

---

#### 4.3.3. Identifizierung des 4-PAM-modifizierten HDAH-Cysteins

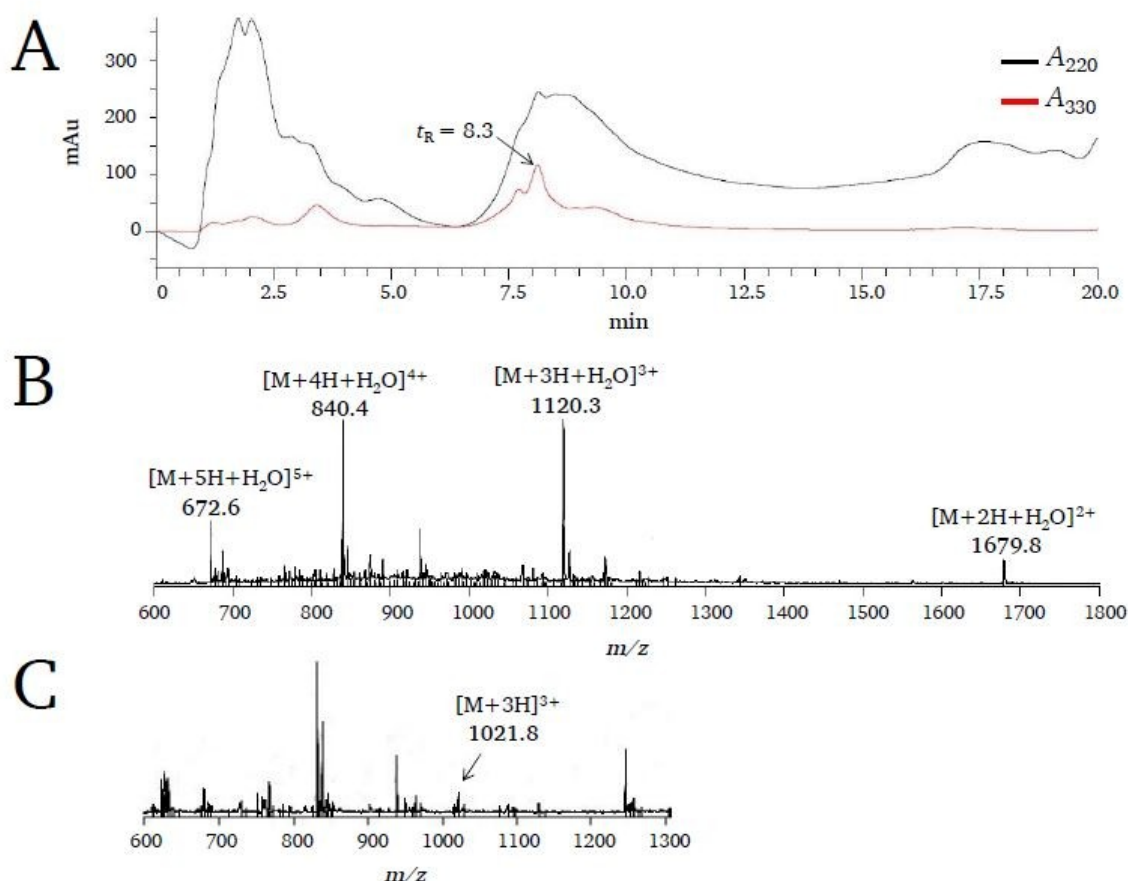
---

Für die Identifizierung des 4-PAM modifizierten HDAH-Wt-Cysteins wurden 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugate sowie eine unmodifizierte HDAH-Probe als Referenz eingesetzt. Das 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat und die Referenzprobe wurden enzymatisch durch Trypsin hydrolysiert und die Peptidfragmente massenspektrometrisch mittels LC-ESI-MS analysiert (Kap. 3.2.17). Die Elution von Peptidfragmenten wurde durch Absorptionsmessung bei 220 nm verfolgt und 4-PAM modifizierte Peptidfragmente bei 330 nm detektiert. Für die Identifikation und Massenzuordnung von 4-PAM modifizierten Peptidfragmenten wurde ein tryptischer Verdau von HDAH *in silico* simuliert und die molare Masse der cysteinenthaltenden Peptidfragmente um die von 4-PAM (277.3 g/mol) erweitert (Tab. 12). Das vollständige Ergebnis des simulierten tryptischen Verdaus von HDAH ist in dem Anhang enthalten (Tab. A. 1). Das LC-MS-Chromatogramm des 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats ist in Abb. 20 und das der HDAH-Referenzprobe im Anhang aufgeführt (Abb. A. 8). Die Identifikation von Trypsin generierten Peptidfragmenten, welche kein Cystein enthielten oder durch unspezifische Spaltung erzeugt wurden, wurde nicht weiter verfolgt.

**Tab. 12: Prognostizierte Peptidmassen von 4-PAM modifizierten Cystein-Fragmenten, basierend auf der Simulation eines tryptischen Verdaus.** Der tryptische Verdau wurde mit dem ExPASy-Server basierten Programm „*PeptideCutter*“ simuliert. Die in Dalton angegebenen Peptidmassen stellen Massen mit durchschnittlicher Isotopenverteilung dar. C<sub>1/2</sub> = C295 (C1) oder C300 (C2) wurde durch 4-PAM modifiziert. C<sub>1+2</sub> = beide Cysteine (C295 und C300) wurden durch 4-PAM modifiziert. Die Fragmentnummerierung entspricht der Gesamtanzahl der Trypsin-generierten Peptidfragmente, vom N-Terminus beginnend (Tab. A. 1).

Fragment	Peptidsequenz	Peptidmasse / Da	
		unmodifiziert	+ 4-PAM
5	FHELV <sup>C<sub>51</sub></sup> ASGQIEHLTPIAAVAATDADILR	3062.5	3339.8
11	VATGELSAGYALVNPPGHHAPHNAAMGF <sup>C<sub>153</sub></sup> IFNNTSVAAGYAR	4255.8	4533.0
13	VAILDWDVHHGNGTQDIWWNDPSVLTISLHQHL <sup>C<sub>207</sub></sup> FPPD SGYSTER	5158.7	5435.9
19	TID <sup>C<sub>295</sub></sup> AADI <sup>C<sub>300</sub></sup> DGR	1252.4	C <sub>1/2</sub> = 1529.7 C <sub>1+2</sub> = 1806.9
20	IVFVQEGGYSPHYLPF <sup>C<sub>320</sub></sup> GLAVIEELTGVR	3194.7	3472.0

Durch die Simulation des tryptischen Verdaus von HDAH-Wt konnten fünf cysteinenthaltende Peptidfragmente (5, 11, 13, 19 und 20) identifiziert werden. Vier Peptidfragmente enthielten jeweils ein Cystein (5, 11, 13 und 20) und das Peptidfragment 20 zwei Cysteine (Tab. A. 1).



**Abb. 20: LC-ESI-MS Analyse des Trypsin-hydrolysierten 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats.** (A) LC-Chromatogramm. Die allgemeine Detektion von Peptidfragmenten erfolgte durch Absorptionsmessung bei 220 nm (schwarze Linie) sowie die von 4-PAM-modifizierten Peptidfragmenten bei 330 nm (rote Linie). (B) Massenspektrum 7.917 - 8.650 min und (C) 4.717 - 5.567 min. Die wichtigsten  $m/z$ -Verhältnisse wurden durch Angabe der entsprechenden Protonierung gekennzeichnet. Die 4-PAM Modifikation von HDAH, der tryptische Verdau und die Durchführung der LC-ESI-MS Messung erfolgte wie in Kap. 3.2.17 beschrieben. mAu = Milliabsorptionseinheiten. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

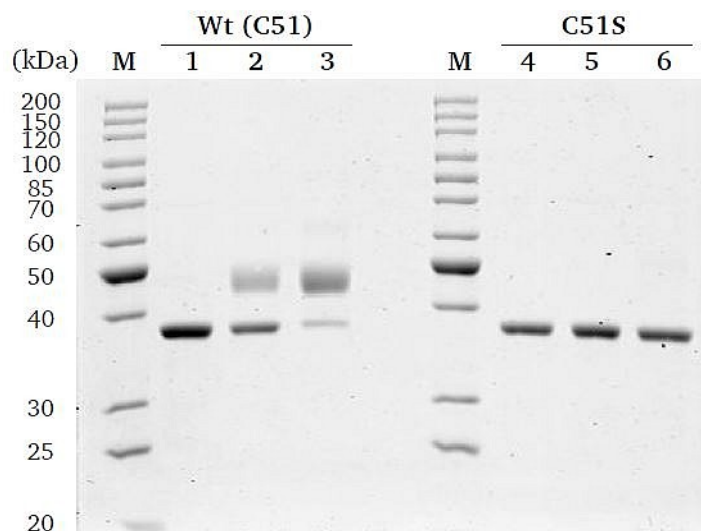
Durch die LC-ESI-MS Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die 4-PAM-Modifikation an dem HDAH-Cystein 51 stattfand. Das 4-PAM modifizierte Peptidfragment (3339.8 g/mol, Fragment 5, Tab. 12) wurde durch Absorptionsmessung bei 330 nm sowie einer Retentionszeit ( $t_R$ ) von 8.3 min detektiert (Abb. 20 A) und anhand von vier verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen (1679.8  $[M+2H+H_2O]^{2+}$ , kalk. 3339.6 g/mol; 1120.3  $[M+3H+H_2O]^{3+}$ , kalk. 3339.9 g/mol; 840.4  $[M+4H+H_2O]^{4+}$ , kalk. 3339.6 g/mol; und 672.6  $[M+5H+H_2O]^{5+}$ , kalk. 3340 g/mol) nachgewiesen (Abb. 20 B). Das 4-PAM-modifizierte Peptidfragment wies zudem eine um 18 g/mol erhöhte Masse auf, welches  $H_2O$  als auftretenden ESI+ Cluster identifizierte. Die anderen vier cysteinenthaltenden Peptidfragmente (Fragment 11, 13, 19 und 20, Tab. 12) konnten nicht detektiert werden. Das C51 enthaltende unmodifizierte Peptidfragment, für das eine molare Masse von 3062.5 g/mol vorhergesagt



wurde (Fragment 5; Tab. 12), konnte bei einer Retentionszeit ( $t_R$ ) von 5.1 min, mit einem  $m/z$ -Verhältnis von 1021.8  $[M+3H]^{3+}$  (kalk. 3062.4 g/mol), ohne zusätzliche Massenaddition von  $H_2O$  nachgewiesen werden (Abb. 20 C). Bei der zusätzlich mitgeführten Referenzprobe (HDAH ohne 4-PAM-Modifikation, Abb. A. 8) konnte ebenfalls die prognostizierte Masse des 4-PAM unmodifizierten, C51 enthaltenden Peptidfragments (Tab. 12, Fragment 5, 3062.5 g/mol) mit einem  $m/z$ -Verhältnis von 1021.8  $[M+3H]^{3+}$  (kalk. 3062.4 g/mol) nachgewiesen werden. Die  $t_R$  belief sich dabei auf 4.7 min, etwas schneller als für das unmodifizierte C51 enthaltende Peptidfragment in dem 4-PAM/HDAH Konjugatansatz ( $t_R$  = 5.1 min).

#### 4.3.4. Verifizierung des 4-PAM modifizierten HDAH-Cysteins

Zur Verifikation der LC-ESI-MS Ergebnisse (Kap. 4.3.3), dass die 4-PAM Modifikation an HDAH-Cystein 51 stattfand, wurde das genannte Cystein mittels ortsspezifischer Mutagenese (Kap. 3.1.5.1) gegen Serin substituiert und die HDAH-Variante C51S exprimiert (Kap. 3.2.3). Die verwendeten Mutagenese-Primer wurden in Tab. 2 aufgeführt. Der HDAH-Wt (C51) und die HDAH-Variante C51S wurden mit einem thiolreaktiven PEG-M (5000 g/mol) in einem 4- und 20-fach molaren Überschuss modifiziert (Kap. 3.2.11) und die durch PEG-M-Modifikation resultierende Massenverschiebung mittels SDS-PAGE (Kap. 3.2.7) nachgewiesen (Abb. 21).



**Abb. 21: PEG-M-Modifikation von HDAH-Wt und HDAH-Variante C51S.** HDAH-Wt (C51) und HDAH-Variante C51S wurden mit einem 4- und 20-fach molaren Überschuss an PEG-M (5000 Da) modifiziert (Kap. 3.2.11) und die Kopplung mittels SDS-PAGE (10 % PA-Gel) verifiziert (Kap. 3.2.7). M = Proteingrößenstandard (*PageRuler unstained protein ladder*); 1 HDAH-Wt; 2 = PEG-M/HDAH-Wt (4-fach); 3 = PEG-M/HDAH-Wt (20-fach); 4 = HDAH-C51S; 5 = PEG-M/HDAH-C51S (4-fach); 6 = PEG-M/HDAH-C51S (20-fach). Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Anhand der mittels ortsspezifischer Mutagenese generierten HDAH-Variante C51S konnte gezeigt werden, dass nur HDAH-Wt (C51) durch PEG-M modifiziert werden konnte (Abb. 21, vgl. Gelspur 1 vs. Gelspur 2 und 3) und eine Modifikation an HDAH-Variante C51S ausblieb (vgl. Gelspur 4 vs. Gelspur 5 und 6). Die PEG-M Kopplungseffizienz von HDAH-Wt, Verschiebung der Proteinbande von  $\sim 39$  auf  $\sim 45$  kDa, konnte bei Verwendung eines 4-fach molaren Überschuss auf 56 % (Abb. 21, Gelspur 2) und bei einem 20-fach molaren Überschuss auf 90 % (Gelspur 2) abgeschätzt werden. Für die Abschätzung wurde das Programm ImageJ verwendet.

Durch dieses Experiment konnte eindeutig bestätigt werden, dass das HDAH-Wt Cystein 51 den einzigen Ankopplungspunkt für die Modifikation von 4-PAM darstellte. Die HDAH-Variante C51S wurde als Basisvariante für weitere ortsspezifische Mutagenese Experimente verwendet, zur Entwicklung einer photoschaltbaren HDAH.

---

#### **4.4. Screening nach photoschaltbaren HDAH-Varianten**

---

Um die Photoschaltung der HDAH-Aktivität systematisch durch reversible, sterische Blockierung des Aktivkanaleingangs bzw. Aktivzentrums durch *cis/trans* Photoisomerisierung von 4-PAM kontrollieren zu können, wurden verschiedene HDAH-Varianten auf Basis der HDAH-Variante C51S mit jeweils einem unterschiedlich lokalisierten oberflächenzugänglichen Cystein generiert (Kap. 4.4.1). Die eingeführten Cysteinpositionen dienen dabei als selektive 4-PAM-Ankopplungsstellen. Die Modifikationseffizienz der neuen Cystein-HDAH-Varianten wurde durch DOL-Wertbestimmung ermittelt (Kap. 4.4.2), die Photoisomerisierung von gekoppeltem 4-PAM an den HDAH-Varianten überprüft (Kap. 4.4.3) und die Photoschaltung der Enzymaktivität von 4-PAM/HDAH-Variant Konjugaten mittels Michaelis-Menten Kinetiken (Kap. 4.4.4) untersucht.

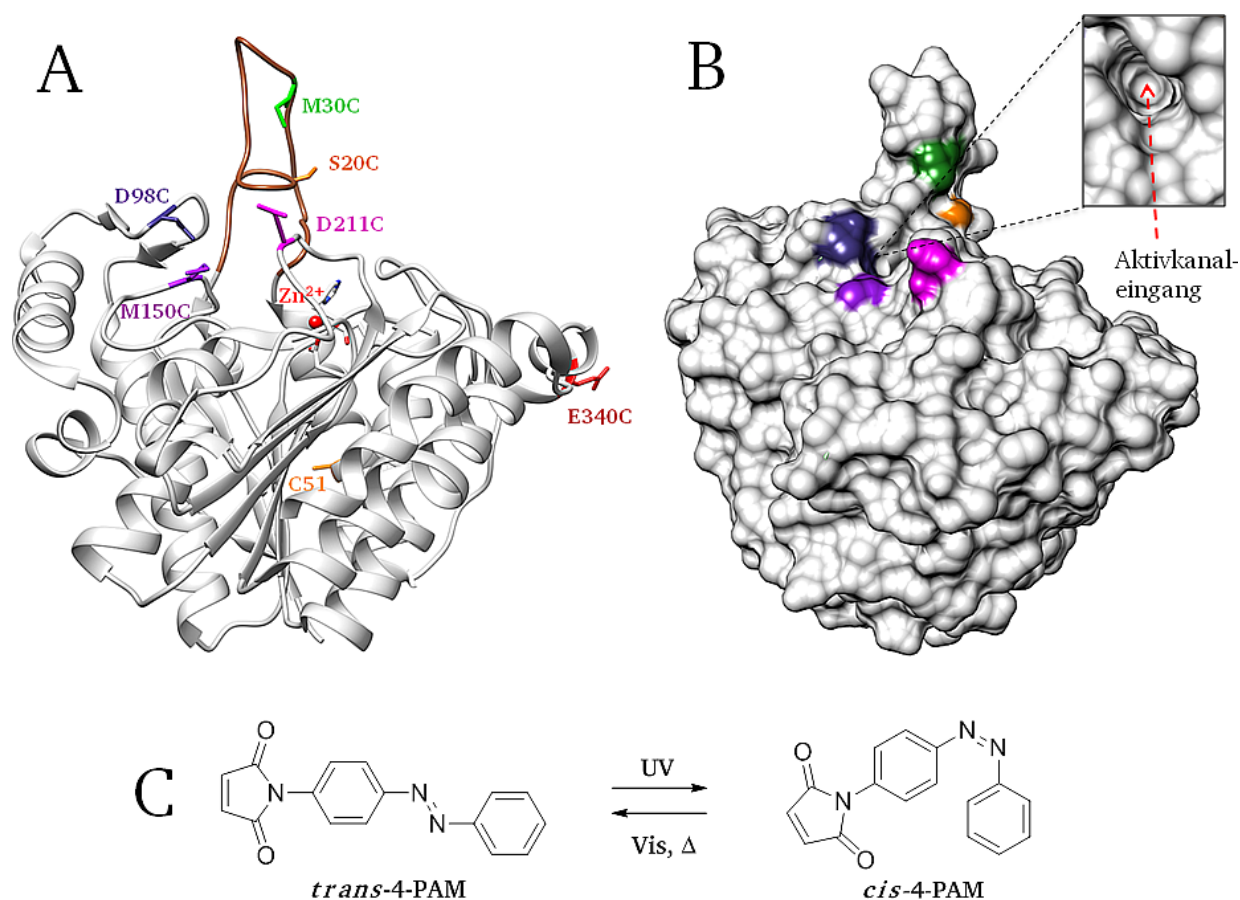
---

##### **4.4.1. Generierung von Cystein-HDAH-Varianten**

---

Die Cysteine wurden rational, auf Basis von HDAH-Variante C51S mittels ortsspezifische Mutagenese (Kap. 3.1.5.1), nahe dem Aktivkanaleingang bzw. des Aktivzentrum (S20C, M30C, D98C, M150C und D211) sowie davon entfernt (E340C) positioniert (Abb. 22 A). Die HDAH-Variante E340C diene zusätzlich zu HDAH-Wt (C51) als Referenz für die Untersuchung der Photoschaltung der HDAH-Enzymaktivität. Die verwendeten Mutagenese-Primer wurden in Tab. 2 aufgeführt. Für eine bessere Veranschaulichung einer sterischen und reversiblen Blockierung des Aktivkanaleingangs bzw. des Aktivzentrums, durch Photoisomerisierung von angekoppelten 4-PAM in die *cis*- und *trans*-

Konfiguration (Abb. 22 C), wurde die HDAH-Oberfläche mit Cysteinpositionen nahe des Aktivkanaleingangs dargestellt (Abb. 22 B).



**Abb. 22: Generierte Cystein-HDAH-Varianten.** (A) Die in der HDAH-Kristallstruktur (PDB ID: 2VCG, Kette A)<sup>101</sup> farbig markierten Positionen stellen, mit Ausnahme von C51, selektierte Aminosäuren dar, welche jeweils einzeln mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Cystein substituiert wurden (Kap. 3.1.5.1). C51 ist das einzige von sechs existierenden Cysteinen in HDAH-Wt (Abb. 18 A), welches durch 4-PAM modifiziert werden kann. Die flexible Schleifenregion (Aminosäuren 16-38)<sup>99</sup> wurde in braun dargestellt. Für die Gewährleistung einer selektiven 4-PAM Ankopplung an die ausgewählten Cysteine diente HDAH-Variante C51S als Ursprung für die Erzeugung der Cystein-HDAH-Varianten S20C, M30C, D98C, M150C, D211C und E340C. Das Aktivzentrum von HDAH ist durch das katalytische Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ , rote Kugel) illustriert, welches durch ein Histidin (H182) und zwei Aspartatreste (D180 und D268) koordinativ gebunden wird. (B) Illustration der HDAH-Oberfläche sowie den eingeführten Cysteinpositionen um den Aktivkanaleingang (S20C = orange, M30C = grün, D98C = dunkellila, M150C = helllila, D211C = pink). (C) Photoisomerisierung von 4-PAM in die *cis*- und *trans*-Konfiguration, welches nach Ankopplung an die in (B) dargestellten Cysteinpositionen zu einer sterischen und reversiblen Blockierung des Aktivkanaleingangs bzw. des Aktivzentrums führen soll. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

#### 4.4.2. DOL-Wertbestimmung von 4-PAM modifizierten HDAH-Varianten

Die durch ortsspezifische Mutagenese (Kap. 3.1.5.1) generierten Cystein-HDAH-Varianten (S20C, M30C, D98C, M150C, D211C und E340C; Abb. 22 A) wurden exprimiert (Kap. 3.2.3) und die jeweiligen Cysteine durch DOL-Wertbestimmung (Kap. 3.2.15.3) auf 4-PAM-Modifizierbarkeit geprüft. Die nicht durch Maleimidverbindungen koppelbare HDAH-Variante C51S (Kap. 4.3.4, Abb. 21) wurde als Referenz mitgeführt (Tab. 13). Der allgemeine Reinheitsgrad der exprimierten HDAH-Varianten konnte auf 95 % abgeschätzt werden (Abb. A. 9).

**Tab. 13: DOL-Werte von 4-PAM modifizierten HDAH-Varianten.** Das Prozedere für die DOL-Wertbestimmung wurde wie in Kap. 3.2.15.3 beschrieben durchgeführt und für die Kalkulation der DOL-Werte der jeweilige  $\epsilon$ -Wert (Tab. 11) für  $\lambda_{\max}$  des entsprechenden 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugats verwendet. HDAH-Wt wurde zur Vervollständigung mit aufgeführt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate	$\lambda_{\max}$ / nm	DOL-Werte
Wt (C51)	350	1.0
C51S	350	0.1
S20C	335	1.1
M30C	330	1.2
D98C	340	0.6
M150C	360	1.3
D211C	350	0.5
E340C	340	0.6

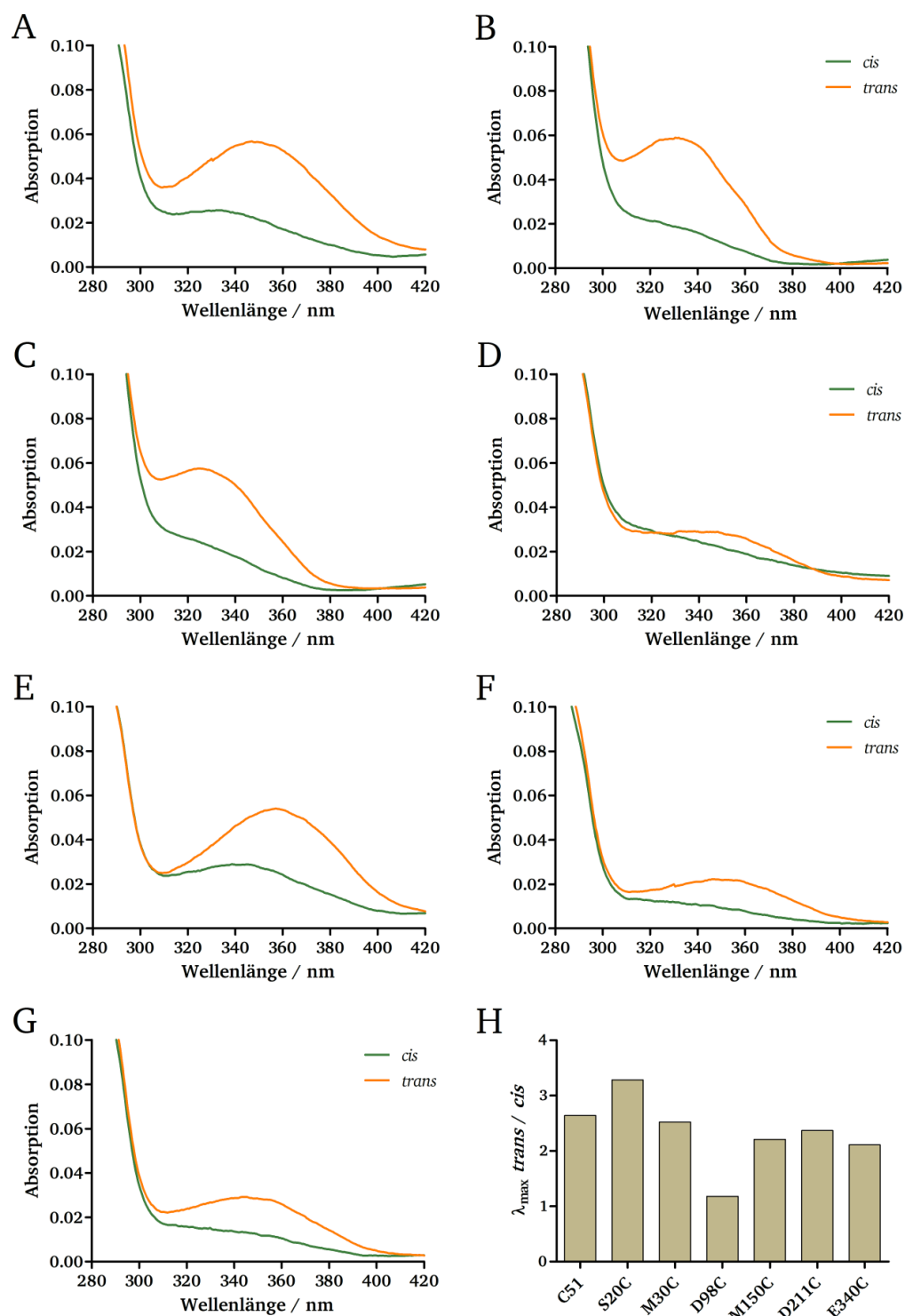
Anhand der DOL-Wertbestimmung konnte gezeigt werden, dass nur die HDAH-Varianten S20C, M30C und M150C vollständig in einem 1:1 molaren Protein/4-PAM Verhältnis gekoppelt werden konnten. Für die HDAH-Varianten D98C, D211C und E340C hingegen, wurden wesentlich geringere DOL-Werte  $\leq 0.6$  bestimmt. Die eingeschränkte 4-PAM-Reaktivität der drei zuletzt genannten Cystein-HDAH-Varianten ist vermutlich auf eine reduzierte Lösungsmittelzugänglichkeit und/oder auf mögliche sterische Hinderung durch benachbarte Aminosäuren zurückzuführen. Die Referenzprobe (HDAH-Variante C51S) wies einen DOL-Wert von 0.1 auf, welcher in dem ermittelten Fehler von  $\pm 13$  % der DOL-Wertbestimmungsmethode lag (Kap. 3.2.15.3). Bezugnehmend auf den erwähnten Fehler wurde der DOL-Wert viel mehr als wegweisender Richtwert und nicht als absoluter Wert zur Quantifizierung angesehen.

---

#### 4.4.3. Photoisomerisierung von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten

---

Nachdem die Ankopplung von 4-PAM an die generierten HDAH-Varianten über DOL-Wertbestimmung quantifiziert werden konnte (Tab. 13), wurde geprüft, ob 4-PAM nach der Biokonjugation weiterhin in die *cis*- und *trans*-Konfiguration photoisomerisiert werden kann. Hierzu wurden die entsprechenden 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate hergestellt (Kap. 3.2.10), diese anschließend mit UV-A (*cis*-Konfiguration) sowie Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt (Kap. 3.2.8.1) und UV/Vis-Spektren der jeweilige Isomere aufgenommen (Kap. 3.2.15.1). Aufgrund der relativ geringen 4-PAM/HDAH-Variant-Konzentration, die generell nach dem Kopplungsprozedere erhalten wurden, wurde die wesentlich besser ausgeprägte Abnahme (UV-A-Bestrahlung, *cis*-Konfiguration) oder die Zunahme der  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande (Blaulichtbestrahlung, *trans*-Konfiguration) in dem jeweiligen  $\lambda_{\max}$  (Tab. 13) beobachtet und nicht die nur gering messbare  $n$ - $\pi^*$  Absorptionsbandenveränderung. Die Photoisomerisierung der 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate sowie das *trans/cis*-Isomerisierungsverhältnis, berechnet aus  $\lambda_{\max}$  von *trans*- zu *cis*-4-PAM (Tab. 13), wurde in Abb. 23 A-H dargestellt.

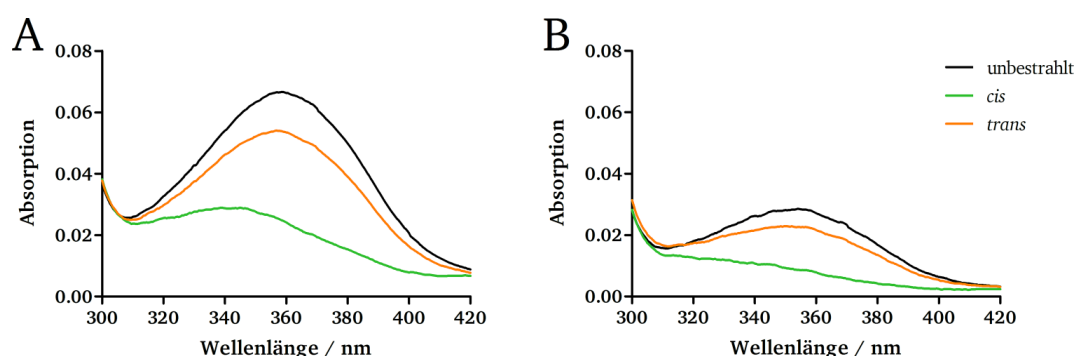


**Abb. 23: *cis/trans*-Photoisomerisierung von 4-PAM gekoppelten HDAH-Varianten.** 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugat Lösungen (3-4  $\mu\text{M}$ , Kap. 3.2.10) wurden zuerst mit UV-A und anschließend mit Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). Die Überführung von 4-PAM in die *cis*- und *trans*-Konfiguration wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt (Kap. 3.2.15.1). Photoisomerisierung von 4-PAM an (A) HDAH-Wt (C51), (B) HDAH-Variante S20C, (C) M30C, (D) D98C, (E) M150C, (F) D211C und (G) E340C. (H) Berechnete Photoisomerisierungsverhältnisse von *trans*- zu *cis*-4-PAM in jeweiligem  $\lambda_{\max}$  des HDAH-Variant-Konjugats (Tab. 13).

Die Photoisomerisierung von 4-PAM in die *cis*- und *trans*-Konfiguration konnte für alle getesteten 4-PAM/HDAH-Variant Konjugate (Abb. 23 A-F) nachgewiesen werden. Bezugnehmend auf die 4-PAM *cis/trans*-Photoisomerisierung, welche im Allgemeinen für alle untersuchten 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate mit  $\geq 2$  bestimmt wurde (S20C (3.3), C51 (2.6), M30C (2.5), D211 (2.4), M150C (2.2) und E340C (2.1), Abb. 23 H), zeigte für das 4-PAM/HDAH-D98C-Konjugat (1.2) eine nur sehr geringe Photoisomerisierung in die *trans*-Konfiguration. Möglicherweise wurde an dieser Cysteinankopplungsstelle die *cis*-zu-*trans*-Isomerisierung von 4-PAM durch die HDAH-Struktur beeinflusst.

Eine Bestimmung der DOL-Werte nach Blaulichtbestrahlung, anhand von *trans*-4-PAM UV/Vis-Spektren, war nicht möglich (Abb. 23 A-F). Im Vergleich zu den in Tab. 13 aufgelisteten DOL-Werten, bei denen das an HDAH-Varianten gekoppelte 4-PAM durch thermisches Relaxation (48 h, 35 °C) in den nahezu vollständigen *trans*-Zustand überführt wurde (Abb. 19 C), wurden nach Blaulichtbestrahlung stets reduzierte DOL-Werte ermittelt. Dieser Sachverhalt deutete auf eine durch Blaulicht-induzierte Bildung der *cis*-4-PAM-Konfiguration hin, welche demnach zu einer Reduktion des *trans*-Anteils und folglich zur Bestimmung von verringerten DOL-Werten führte.

Zur Abschätzung des Blaulicht-induzierten *trans*-Anteils wurde am Beispiel der an HDAH-Varianten M150C und D211 gekoppelte 4-PAM-Rest thermisch (48 h, 35 °C) in die *trans*-Konfiguration überführt ( $\sim 100\%$ ) und die Proben mit UV-A sowie mit Blaulicht bestrahlt (Abb. 24). Der durch Blaulichtbestrahlung erhaltene *trans*-Anteil wurde prozentual in Bezug auf die thermisch relaxierte Probe (unbestrahlt), unter Berücksichtigung von  $\lambda_{\max}$  (Tab. 13), des jeweiligen 4-PAM/HDAH-Konjugats ermittelt.



**Abb. 24: Bestimmung des Blaulicht-induzierten *trans*-4-PAM-Anteils.** 4-PAM wurde an die HDAH-Varianten M150C (A) und D211C (B) gekoppelt (Kap. 3.2.10), die *trans*-Konfiguration durch thermische Relaxation (unbestrahlte Proben) generiert und die 4-PAM/HDAH-Konjugate zuerst mit UV-A und anschließend mit Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). Die jeweiligen UV/Vis-Spektren wurden mit 3  $\mu$ M 4-PAM/HDAH-Konjugat-Lösungen aufgenommen (Kap. 3.2.15.1).



Bei Vergleich der UV/Vis-Spektren der thermisch relaxierten Proben (Abb. 24 A/B, unbestrahlt) von beiden 4-PAM/HDAH-Konjugaten (M150C und D211C), mit denen die nach Blaulichtbestrahlung gemessenen wurden (Abb. 24 A/B, *trans*), konnte festgestellt werden, dass durch Blaulichtbestrahlung der *trans*-Konfigurationsanteil um 19 % reduziert wurde und demnach der *trans*-Anteil auf 81 % bestimmt. Dieser Befund geht einher mit der in DMSO nachgewiesenen Reduzierung des *trans*-Anteils nach Blaulichtbestrahlung, welcher mit ca. 79 % ermittelt wurde (Kap. 4.1) sowie der Quantifizierung des *trans*-Anteils (ca. 75 %) mittels  $^1\text{H}$ -NMR (Kap. 4.2). Eine Übertragung der in DMSO ermittelten PSS (Tab. 10) von 4-PAM auf die Photoisomerisierung von 4-PAM, gekoppelt an HDAH-Varianten, scheint demnach möglich zu sein.

---

#### 4.4.4. Identifizierung von photoschaltbaren HDAH-Varianten

---

Zur Identifikation von HDAH-Varianten, deren Enzymaktivitäten durch *cis/trans* Photoisomerisierung von kovalent angekoppelten 4-PAM geschaltet werden können, wurden Michaelis-Menten Kinetiken von unmodifizierten sowie 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten durchgeführt (Kap. 3.2.13.2) und die Schaltungseffekte anhand der Michaelis-Menten Parameter ( $V_{\max}$  und  $K_m$ ) quantifiziert. Die HDAH-Variante C51S wurde als 4-PAM nicht-modifizierbare Referenzprobe sowie zum Nachweis negativer Einflüsse durch UV-A und Blaulichtbestrahlung auf die Enzymaktivität eingesetzt. HDAH-Wt (C51) und E340C, welche Cysteinmodifikationsstellen fern des Aktivzentrums aufweisen, wurden allgemein als Kontrollen nicht-photoschaltbarer 4-PAM/HDAH-Konjugate verwendet (Abb. 22 A). Die Photoisomerisierung von angekoppeltem 4-PAM in die *cis*- (UV-A) und *trans*-Konfiguration (Blaulicht) erfolgte mittels Handlampenbestrahlung (Kap. 3.2.8.1). Die Michaelis-Menten Kinetiken der 4-PAM/HDAH-Variant Konjugate sowie von dazugehörigen unmodifizierte Proben wurden in Abb. A. 10 dargestellt und die  $V_{\max}$  und  $K_m$ -Werte in Tab. 14 zusammengefasst. Die Identifizierung von photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten sowie die Berechnung der Photoschaltungseffizienz erfolgte wie in Kap. 3.2.13.3 beschrieben.



**Tab. 14:**  $V_{\max}$  and  $K_m$  Werte von 4-PAM modifizierten und unmodifizierten HDAH-Varianten. Die 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate wurden mit UV-A (*cis*-Konfiguration) oder Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt und Michaelis-Menten Kinetiken aufgenommen (Kap. 3.2.13.2). Die  $V_{\max}$  und  $K_m$ -Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  angegeben und einer statistischen Analyse unterzogen (Einfach-ANOVA und Bonferroni post-hoc Test). <sup>a</sup>P < 0.05 (*cis*-4-PAM vs. *trans*-4-PAM), <sup>b</sup>P < 0.05 (unmodifiziert vs. *cis*-4-PAM), <sup>c</sup>P < 0.05 (unmodifiziert vs. *trans*-4-PAM). \* =  $V_{\max}$ -photoschaltbares 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugat (rot markiert). Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

HDAH-Varianten	$V_{\max} / (\text{nM s}^{-1})$		$K_m / \mu\text{M}$			
	unmodifiziert	4-PAM modifiziert	unmodifiziert	4-PAM modifiziert		
		<i>cis</i>	<i>trans</i>		<i>cis</i>	<i>trans</i>
Wt (C51)	3.44 $\pm$ 0.31	3.34 $\pm$ 0.27	3.52 $\pm$ 0.26	50.9 $\pm$ 9.2	58.1 $\pm$ 8.2	56.1 $\pm$ 8.9
C51S	4.22 $\pm$ 0.21	3.78 $\pm$ 0.17	4.01 $\pm$ 0.16	58.7 $\pm$ 6.6	64.9 $\pm$ 7.0	79.1 $\pm$ 7.2
<b>S20C*</b>	7.59 $\pm$ 0.39	<b>5.42 <math>\pm</math> 0.10<sup>a,b</sup></b>	<b>3.27 <math>\pm</math> 0.08<sup>a,c</sup></b>	47.6 $\pm$ 0.7	74.3 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	79.5 $\pm$ 5.9 <sup>c</sup>
<b>M30C*</b>	3.14 $\pm$ 0.25	<b>3.19 <math>\pm</math> 0.25<sup>a</sup></b>	<b>1.59 <math>\pm</math> 0.14<sup>a,c</sup></b>	39.7 $\pm$ 1.3	38.9 $\pm$ 1.7	39.7 $\pm$ 2.5
D98C	0.60 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.04	45.4 $\pm$ 7.8	91.9 $\pm$ 14.7	94.9 $\pm$ 16.8
<b>M150C*</b>	4.90 $\pm$ 0.14	<b>1.45 <math>\pm</math> 0.03<sup>a,b</sup></b>	<b>1.05 <math>\pm</math> 0.02<sup>a,c</sup></b>	51.0 $\pm$ 4.1	96.7 $\pm$ 6.8 <sup>b</sup>	98.2 $\pm$ 9.6 <sup>c</sup>
D211C	2.83 $\pm$ 0.06	2.73 $\pm$ 0.08	2.59 $\pm$ 0.06	50.5 $\pm$ 6.3	68.3 $\pm$ 7.4	62.5 $\pm$ 4.9
E340C	3.70 $\pm$ 0.17	3.05 $\pm$ 0.13	2.73 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	47.8 $\pm$ 2.0	58.9 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	58.7 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>

Durch die Michaelis-Menten Kinetiken konnten drei HDAH-Varianten identifiziert werden (S20C, M30C und M150C), deren Enzymaktivitäten ( $V_{\max}$ -Werte) signifikant durch *cis/trans* Photoisomerisierung des angekoppelten 4-PAM-Rest geschaltet werden konnten (Tab. 14; rot markiert\*). Der größte Unterschied bezüglich der  $V_{\max}$ -Wertänderung konnte für das 4-PAM/HDAH M30C-Konjugat nachgewiesen werden. Hierbei wurde der  $V_{\max}$  durch *trans*-Isomerisierung ( $1.59 \pm 0.14 \text{ nM s}^{-1}$ ), verglichen mit der *cis*-Konfiguration ( $3.19 \pm 0.25 \text{ nM s}^{-1}$ ), um ca. 50 % reduziert. Im Vergleich zur unmodifizierten HDAH-Variante M30C wurde für die Enzymaktivität des 4-PAM/HDAH M30C-Konjugats in *cis*-Konfiguration ein ähnlicher Wert nachgewiesen (Tab. 14).

Neben dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat konnte eine weitere photoschaltbare HDAH-Variante nachgewiesen werden (4-PAM/HDAH-S20C), deren Enzymaktivität durch 4-PAM-Photoisomerisierung gesteuert werden konnte. In diesem Fall wurde die Enzymaktivität durch Isomerisierung von der *cis*- ( $5.42 \pm 0.10 \text{ nM s}^{-1}$ ) in die *trans*-Konfiguration ( $3.27 \pm 0.08 \text{ nM s}^{-1}$ ) um 40 % reduziert. Verglichen

mit der unmodifizierten HDAH-Variante S20C ( $7.59 \pm 0.39 \text{ nM s}^{-1}$ ) wurde die Enzymaktivität des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats, in Bezug auf die *cis*-Konfiguration, um 29 % reduziert.

Als dritte photoschaltbare HDAH-Variante konnte das 4-PAM/HDAH-M150C-Konjugat identifiziert werden, dessen Enzymaktivität durch Isomerisierung von der *cis*- ( $1.45 \pm 0.03 \text{ nM s}^{-1}$ ) in die *trans*-Konfiguration ( $1.05 \pm 0.02 \text{ nM s}^{-1}$ ) zu einem geringeren Anteil (29 %) kontrolliert werden konnte. Zudem wurde festgestellt, dass die Enzymaktivitäten mancher HDAH-Varianten (S20C, D98C und M150C), in Bezug auf die HDAH-Wt (C51) Aktivität, durch die jeweiligen Mutationen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst wurde. Am Beispiel der HDAH-Variante S20C (unmodifiziert) wurde durch Cysteinsubstitution eine Enzymaktivitätssteigerung um mehr als das 2-fache erhalten, während die Aktivität der HDAH-Variante D98C sich auf 18 % Restaktivität von HDAH-Wt reduzierte. Zudem wurde beobachtet, dass eine kovalente 4-PAM Modifikation in manchen Fällen die Enzymaktivität negativ beeinflusst. Davon war insbesondere das *cis*-4-PAM/HDAH-M150C-Konjugat betroffen, dessen Enzymaktivität um 71 % reduziert wurde (Tab. 14).

Bei allgemeinem Vergleich der  $K_m$ -Werte zwischen den getesteten unmodifizierten HDAH-Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede bestimmt werden. Die kovalente Kopplung von 4-PAM in der *cis*-Konfiguration führte jedoch zu signifikant erhöhten Substrataffinitäten der HDAH-Varianten S20C (1.7-fach), M150C (1.9-fach) und E340C (1.2-fach). Ein Zusammenhang zwischen der *cis*-konfigurationsabhängigen Steigerung der Enzymaktivität und einer simultan stattfindenden Zunahme der Substrataffinität konnte für die 4-PAM/HDAH-S20C und M150C Konjugate nicht nachgewiesen werden. Der  $K_m$ -Wert blieb in diesem Zusammenhang und im Vergleich zu den in der *trans*-Konfiguration gemessenen Werte unverändert (Tab. 14). Anhand der mitgeführten Referenzprobe HDAH-C51S, welche nicht durch 4-PAM modifiziert wird, konnte gezeigt werden, dass die applizierte UV-A und Blaulichtbestrahlung keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität verursachte. Die  $V_{\max}$ -Werte blieben unverändert. Die als Photoschaltungsreferenzproben eingesetzten 4-PAM/HDAH-Wt (C51) und E340C Konjugate, welche eine 4-PAM-Modifikation von dem Aktivzentrum entfernt aufweisen (Abb. 22 A), bestätigten deren Einsatz als Kontrollen. Für beide genannten HDAH-Proben konnte keine Photoschaltung der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Tab. 14).

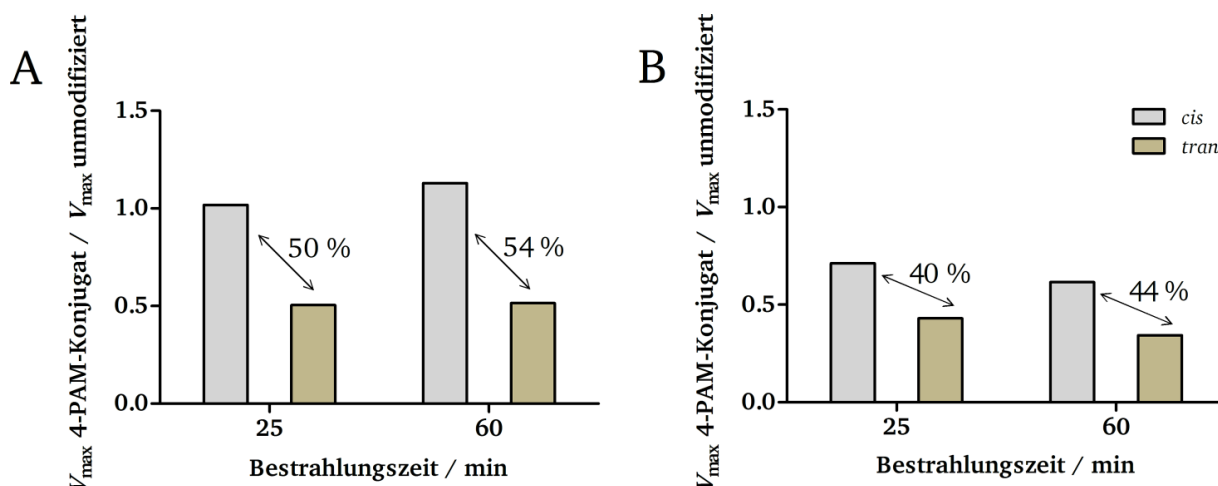
---

#### 4.4.5. Steigerung der Photoschaltungseffizienz durch längere Bestrahlungszeit

---

Bezugnehmend auf die in DMSO quantifizierten PSS von 4-PAM (Tab. 10) wurde untersucht, ob eine Steigerung der Photoschaltungseffizienz durch insbesondere eine längere UV-A sowie Blaulicht Bestrahlungszeit erzielt werden konnte. Hierzu wurden die beiden identifizierten, am stärksten

photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate M30C (50 %) und S20C (40 %) eingesetzt und diese 60 min, anstelle von 25 min bestrahlt. Um die Photoschaltungseffizienz zwischen 25 min (Tab. 14) und 60 min bestrahlten Proben vergleichen zu können, wurden die  $V_{\max}$ -Werte des entsprechenden 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugats auf die jeweilige unmodifizierte HDAH-Variante normiert und das Verhältnis gegen die entsprechende Bestrahlungszeit aufgetragen (Abb. 25 A/B).



**Abb. 25: Einfluss der UV-A und Blaulichtbestrahlungszeit auf die Photoschaltungseffizienz der 4-PAM/HDAH M30C und S20C Konjugate.** Die HDAH-Varianten M30C (A) und S20C (B) wurden mit 4-PAM gekoppelt (Kap. 3.2.10) und die 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate 25\* und 60 min mit UV-A (*cis*-Konfiguration) oder Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt (Kap. 3.2.8.1). Aus den Michaelis-Menten Kinetiken (Kap. 3.2.13.2) wurde der jeweilige  $V_{\max}$ -Wert der *cis*- und *trans*-Konfiguration gegen die entsprechende unmodifizierte HDAH-Variante normiert, dieser gegen die entsprechende Bestrahlungszeit aufgetragen und die Photoschaltungseffizienz prozentual berechnet (Kap. 3.2.13.3). \* = Die dargestellten Verhältnisse für 25 min entsprechen den Werten aus Tab. 14.

Durch eine längere UV-A und Blaulichtbestrahlungszeit von 60 min konnte, im Vergleich zu 25 min, keine bemerkenswerte Steigerung der Photoschaltungseffizienz bei beiden 4-PAM/HDAH-Konjugaten (M30C und S20C) festgestellt werden (Abb. 25 A/B). Aufgrund der Tatsache, dass eine 2.4-fach längere (60 min) UV-A und Blaulichtbestrahlungszeit bei beiden getesteten 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten nur zu einer sehr geringfügig gesteigerten Photoschaltungseffizienzen um 4 % führte, wurde eine Bestrahlungszeit von 25 min beibehalten.

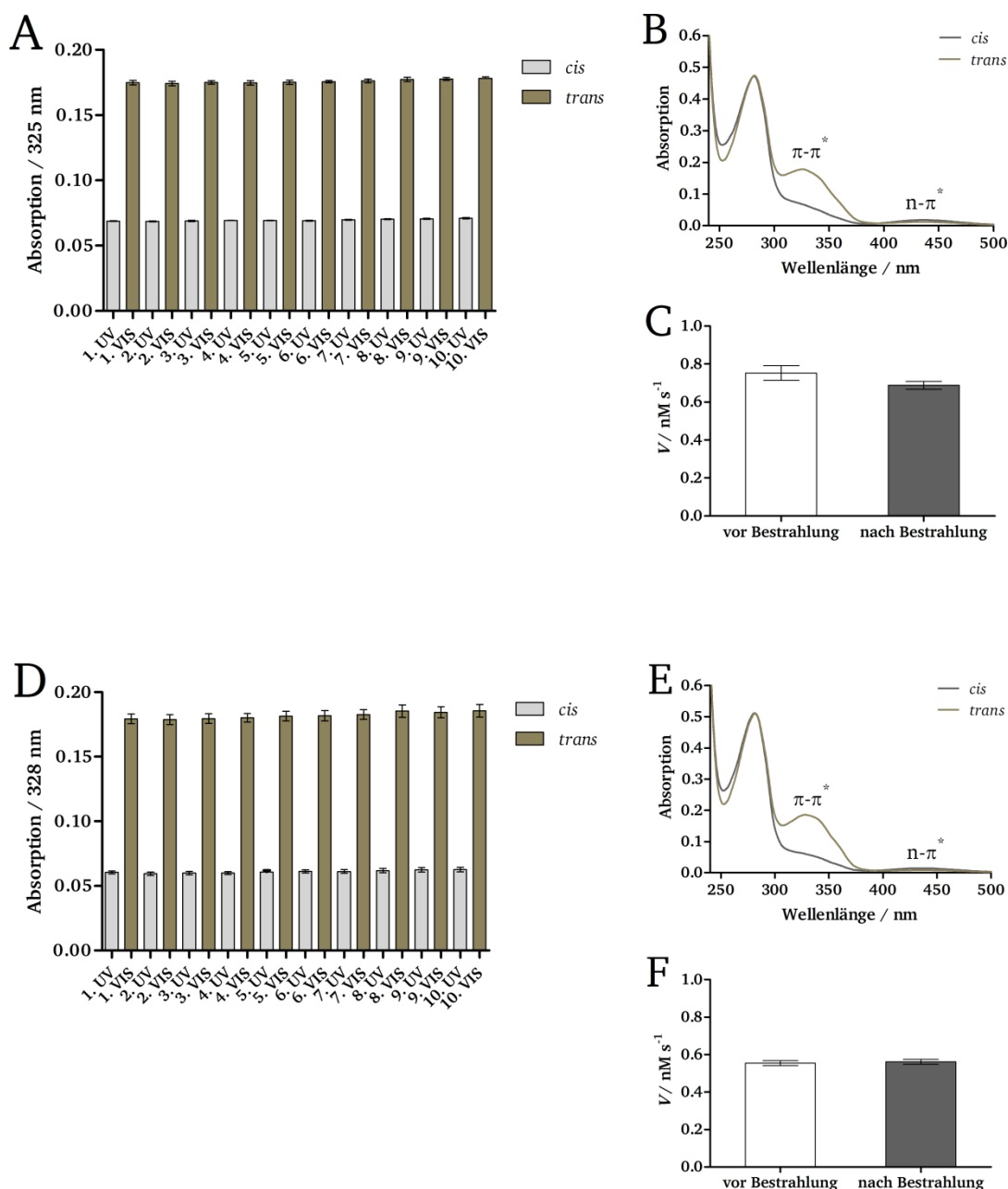
Bezugnehmend auf die ermittelten PSS für 4-PAM in DMSO, bei denen eine 60 minütige UV-A-Bestrahlungszeit zu einer Steigerung des *cis*-Anteils von 50.3 % auf 89.4 % führte (Tab. 10), konnte keine Verbesserung der Photoschaltungseffizienz für die 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate aufgezeigt werden (Abb. 25). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die Photoschaltung der  $V_{\max}$ -Werte hauptsächlich durch den gebildeten *trans*-Anteil gesteuert wurde. Dies würde erklären weshalb die

Photoschaltungseffizienz nicht maximiert werden konnte, denn der *trans*-Anteil wird durch eine Erhöhung der Blaulichtbestrahlungszeit von 25 auf 60 min nicht gesteigert (Tab. 10).

#### 4.4.6. Multiple Photoisomerisierung von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten

Nachdem drei photoschaltbare 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugate identifiziert werden konnten, wurde untersucht, ob die reversible *cis/trans*-Photoisomerisierung von gekoppeltem 4-PAM an HDAH-Varianten in mehreren sequentiellen Bestrahlungszyklen durchgeführt werden kann. Die photoschaltbare HDAH-Variante M150C wurde aufgrund der vergleichbar geringeren Photoschaltungseffizienz nicht weiter berücksichtigt und für weiter folgende Experimente HDAH-S20C und M30C in den Vordergrund gerückt. Für die Realisierung von mehreren reversiblen Photoisomerisierungszyklen von 4-PAM in kürzerer Zeit wurde nun anstatt der Handlampenbestrahlung (Kap. 3.2.8.1) eine Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe (200 W, *Superlite* SUV-DC-E, Lumatec) eingesetzt. Die Bestrahlungsbedingungen (Bestrahlungszeit, -stärke und -abstand zur Probe) wurden anhand des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats auf die Handlampenbestrahlung angepasst, durch Ausbildung eines *trans/cis*-Isomerisierungsverhältnis der  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande von 2.5 (Abb. 23 H). Die dafür erforderlichen Bestrahlungsbedingungen wurden in Kap. 3.2.8.2 erwähnt.

Für das Photoisomerisierungsexperiment wurden die HDAH-Varianten M30C und S20C (70  $\mu$ M) mit 4-PAM modifiziert (Kap. 3.2.10) und die 4-PAM/HDAH-Konjugat-Lösungen mit je 10 alternierenden Zyklen von UV-A (*cis*-Konfiguration) und Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt (Abb. 26 A/D). Nach jeder Bestrahlung wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen und die reversible *cis/trans*-Photoisomerisierung von 4-PAM anhand der  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande, im jeweils gemessenen  $\lambda_{\max}$  (4-PAM/HDAH-M30C = 325 nm; S20C = 328 nm), als relative Absorption gegen den entsprechenden Bestrahlungszyklus aufgetragen. Ein Auszug eines kompletten UV/Vis-Spektrums der 4-PAM/HDAH-Konjugate M30C und S20C (Abb. 26 B/F) in der *cis*- und *trans*-Konfiguration wurde nach der ersten UV-A (1. UV) sowie Blaulichtbestrahlung (1. VIS) dargestellt. Zur Untersuchung der mehrfach applizierten UV-A und Blaulichtbestrahlung auf die Enzymaktivität wurden die Aktivitäten (nM s<sup>-1</sup>) der 4-PAM/HDAH-M30C und S20C Konjugate vor Ausführung der alternierenden Bestrahlungszyklen und danach gemessen (Abb. 26 C/F). Vor der Durchführung der Enzymaktivitätsbestimmung wurden die 4-PAM/HDAH-Konjugat-Proben einmalig mit Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.2), um gleiche PSS von 4-PAM zu erzeugen und damit gleiche Aktivitäten messen zu können. Der zuletzt genannte Schritt induziert hauptsächlich die *trans*-Konfiguration und demnach das inaktivere 4-PAM/HDAH-Konjugat. Die Aktivitätsbestimmung (Kap. 3.2.13.1) erfolgte in Triplikaten mit 20  $\mu$ M Substrat (Boc-Lys-(Ac)-AMC).



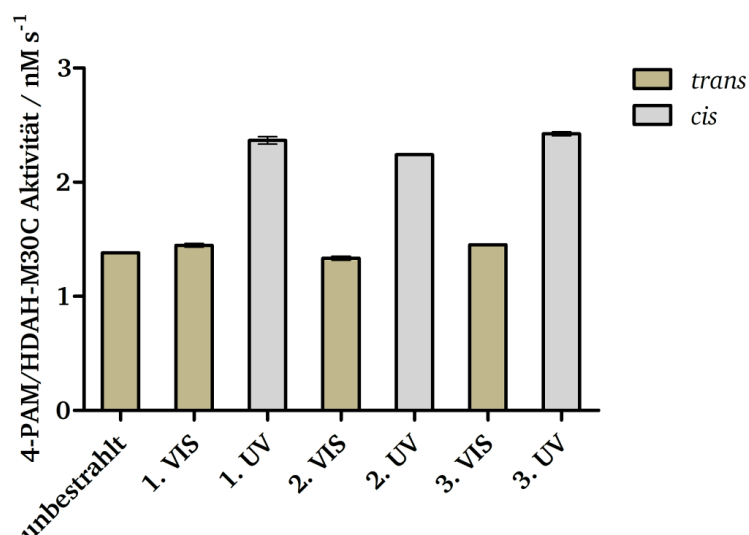
**Abb. 26: Multiple *cis/trans*-Photoisomerisierung von gekoppeltem 4-PAM an den HDAH-Varianten M30C und S20C.** Die 4-PAM/HDAH-Konjugat Lösungen (8  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{l}$ ) von M30C (A) und S20C (D) wurden mit je 10 alternierenden Zyklen von UV-A (UV, *cis*-Konfiguration) sowie Blaulicht (VIS, *trans*-Konfiguration) bestrahlt (Kap. 3.2.8.2) und UV/Vis-Spektren aufgenommen (Kap. 3.2.15.1). Die multiplen *cis/trans*-Isomerisierungen von 4-PAM wurden anhand der  $\pi-\pi^*$ -Absorptionsbande, im jeweils gemessenen  $\lambda_{\text{max}}$ , als relative Absorption gegen den entsprechenden Bestrahlungszyklus aufgetragen. Exemplarische UV/Vis-Spektren von angekoppeltem 4-PAM an HDAH-M30C (B) und S20C (E) in *cis*- und *trans*-Konfiguration zum Zeitpunkt 1. UV und 1. VIS (A/D). 4-PAM/HDAH-Konjugat-Aktivitäten ( $\text{nM s}^{-1}$ ) von M30C (C) und S20C (F) vor der Bestrahlung ( $t = 0$  + einmalige Blaulichtbestrahlung) und nach Abschluss der Photoisomerisierungszyklen ( $t = 10$ . VIS + einmalige Blaulichtbestrahlung). Die in A, B, D und E dargestellten Werte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM, einer unabhängigen Dreifachbestimmung ( $n = 3$ ). Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Durch den Photoisomerisierungsversuch konnte gezeigt werden, dass eine multiple und reversible *cis/trans*-Isomerisierung von 4-PAM an den HDAH-Variant-Konjugaten M30C (Abb. 26 A) und S20C (Abb. 26 B) über mehrere alternierende UV-A und Blaulichtbestrahlungszyklen ohne Verluste der Photoisomerisierungseffizienz (*trans/cis*-Isomerisierungsverhältnis in  $\lambda_{\max}$  der  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande) durchgeführt werden konnte. Basierend auf dieser Beobachtung konnte eine Photozerstörung von angekoppeltem 4-PAM durch insbesondere die eingetragene UV-A aber auch Blaulichtbestrahlung ausgeschlossen und demnach 4-PAM als robuster Photoschalter charakterisiert werden. Für das 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat konnte eine Photoisomerisierungseffizienz von 2.5 und für das S20C-Konjugat 3.0 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den *trans/cis*-Isomerisierungsverhältnissen, die mit Handlampenbestrahlung erzeugt wurden (Kap. 3.2.8.1), wies das 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat einen Isomerisierungsverlust von ca. 9 % auf, während das von M30C konstant blieb. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die von der Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe eingetragene UV-A und Blaulichtbestrahlung (Kap. 3.2.9) keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivitäten des 4-PAM/HDAH M30C (Abb. 26 C) und S20C Konjugats (Abb. 26 F) nahm.

#### 4.4.7. Reversible Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-M30C Aktivität

Nachdem die reversible und multiple Photoisomerisierung von 4-PAM an HDAH-M30C ohne Beeinträchtigung der Photoisomerisierungseffizienz (Abb. 26 A) und der Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, wurde die reversible Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Aktivität untersucht. Das 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat wurde bei diesem Versuch, aufgrund einer geringeren nachgewiesenen Photoschaltungseffizienz als das 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat (Abb. 25 A/B) sowie eines reduzierten *trans/cis*-Isomerisierungsverhältnis von 9 % (Kap. 4.4.6), nicht berücksichtigt.

HDAH-M30C wurde mit 4-PAM modifiziert (Kap. 3.2.10) und die 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Lösung (3  $\mu$ M, 600  $\mu$ l) mit der Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe in je drei alternierenden Blaulicht und UV-A Bestrahlungszyklen bestrahlt (Kap. 3.2.8.2). Nach jeder Bestrahlung wurden 40  $\mu$ l des photoisomerisierten 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat aus der Quarzglasküvette entnommen, davon die Enzymaktivität ( $\text{nM s}^{-1}$ ) bestimmt und diese gegen den entsprechenden Bestrahlungsschritt aufgetragen (Abb. 27). Zusätzlich zu dem UV-A und Blaulicht bestrahlten 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat wurde vor Ausführung der Bestrahlungszyklen die Enzymaktivität der dunkel gelagerten und unbestrahlten Probe gemessen. Die Aktivitätsmessung (Kap. 3.2.13.1) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 120  $\mu$ l (96  $\mu$ l 500  $\mu$ M Boc-Lys(Ac)-AMC, 10  $\mu$ l Trypsin (6 mg/ml), 10  $\mu$ l bestrahltes 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat und 4  $\mu$ l MKA-Puffer).



**Abb. 27: Reversible Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Aktivität.** Eine 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Lösung (3  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{l}$ ) wurde mit drei alternierenden Blaulicht (VIS) und UV-A (UV) Bestrahlungszyklen bestrahlt (Kap. 3.2.8.2) und die gemessenen Enzymaktivitäten ( $\text{nM s}^{-1}$ ) in Abhängigkeit des jeweiligen Bestrahlungsschritts aufgetragen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie oben im Text beschrieben bei einer Substratkonzentration von 400  $\mu\text{M}$  Boc-Lys(Ac)-AMC, 250 nM Konjugat und 0.5 mg/ml Trypsin. Die kalkulierten Werte stellen Mittelwerte von Triplikaten dar  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Durch dieses Experimente konnte gezeigt werden, dass die 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Aktivität ( $\text{nM s}^{-1}$ ) reversibel durch Photoisomerisierung von 4-PAM in die *trans*- und in die *cis*-Konfiguration direkt in wässriger Lösung (MK-Puffer) photokontrolliert werden konnte. Generell führte die Isomerisierung von 4-PAM in die *trans*-Konfiguration (Abb. 27, VIS 1-3) zu erniedrigten Enzymaktivitäten, während die *cis*-Konfiguration stets zu einer reversiblen Steigerung der Enzymaktivität führte (Abb. 27, UV 1-3). Zyklus 1 (VIS =  $1.45 \pm 0.02 \text{ nM s}^{-1}$ ; UV =  $2.37 \pm 0.03 \text{ nM s}^{-1}$ ), Zyklus 2 (VIS =  $1.33 \pm 0.02 \text{ nM s}^{-1}$ ; UV =  $2.24 \pm 0.01 \text{ nM s}^{-1}$ ) und Zyklus 3 (VIS =  $1.45 \pm 0.01 \text{ nM s}^{-1}$ ; UV =  $2.42 \pm 0.03 \text{ nM s}^{-1}$ ). Im Vergleich zu den bestimmten  $V_{\text{max}}$ -Werten der Michaelis-Menten Kinetiken, wobei die *cis*- und *trans*-Konfigurationen jeweils isoliert untersucht und in Lösung nicht reversibel ineinander überführt wurden, wurde in Bezug auf das *cis*-4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat ( $3.19 \text{ nM s}^{-1}$ , 50 % Photoschaltungseffizienz, Tab. 14) eine um 26 % reduzierte Photoschaltung nachgewiesen. Basierend darauf, dass die Bildung der energieärmeren *trans*-Konfiguration in dunkel gelagerten Lösungen thermodynamisch favorisiert wird (Abb. 17 A/B, unbestrahlte Proben) und damit automatisch das inaktivere HDAH-Konjugat generiert wird, wurde die dunkel gelagerte sowie unbestrahlte Probe als Referenz eingesetzt. Dies ermöglichte die Definierung eines Ausgangswerts mit der potentiell am niedrigsten messbaren Enzymaktivität ( $1.38 \pm 0.01 \text{ nM s}^{-1}$ ) und demnach eine



Prüfmöglichkeit, ob durch die alternierende Blaulichtbestrahlung der Ausgangswert der Refrenzprobe wiederholt erreicht werden konnte.

---

## 4.5. Untersuchung des zugrunde liegenden Photoschaltungsmechanismus

---

Nachdem insbesondere zwei photoschaltbare HDAH-Varianten (M30C und S20C) mit Photoschaltungseffizienzen  $\geq 40\%$  entwickelt (Abb. 25 A/B) und die lichtinduzierte, reversible Kontrolle der 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Aktivität in Lösung demonstriert werden konnte (Abb. 27), wurden Untersuchungen hinsichtlich des bestehenden Photoschaltungsmechanismus unternommen. In diesem Zusammenhang wurde die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von 4-PAM und in dessen gekoppelter Form an 4-PAM/HDAH-Konjugaten untersucht (Kap 4.5.1). Dazu ergänzend wurde mit Hilfe von MD-Simulationen das Photoschaltungsverhalten der beiden 4-PAM-Isomere an der Proteinoberfläche der beiden photoschaltbaren HDAH-Varianten M30C und S20C auf atomarer und molekularer Ebene erforscht (Kap. 4.5.2). Um mögliche Änderungen innerhalb der Sekundärstruktur bei 4-PAM/HDAH-Konjugaten nachweisen zu können, hervorgerufen durch 4-PAM *cis/trans*-Isomerisierung, wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (Kap. 4.5.3).

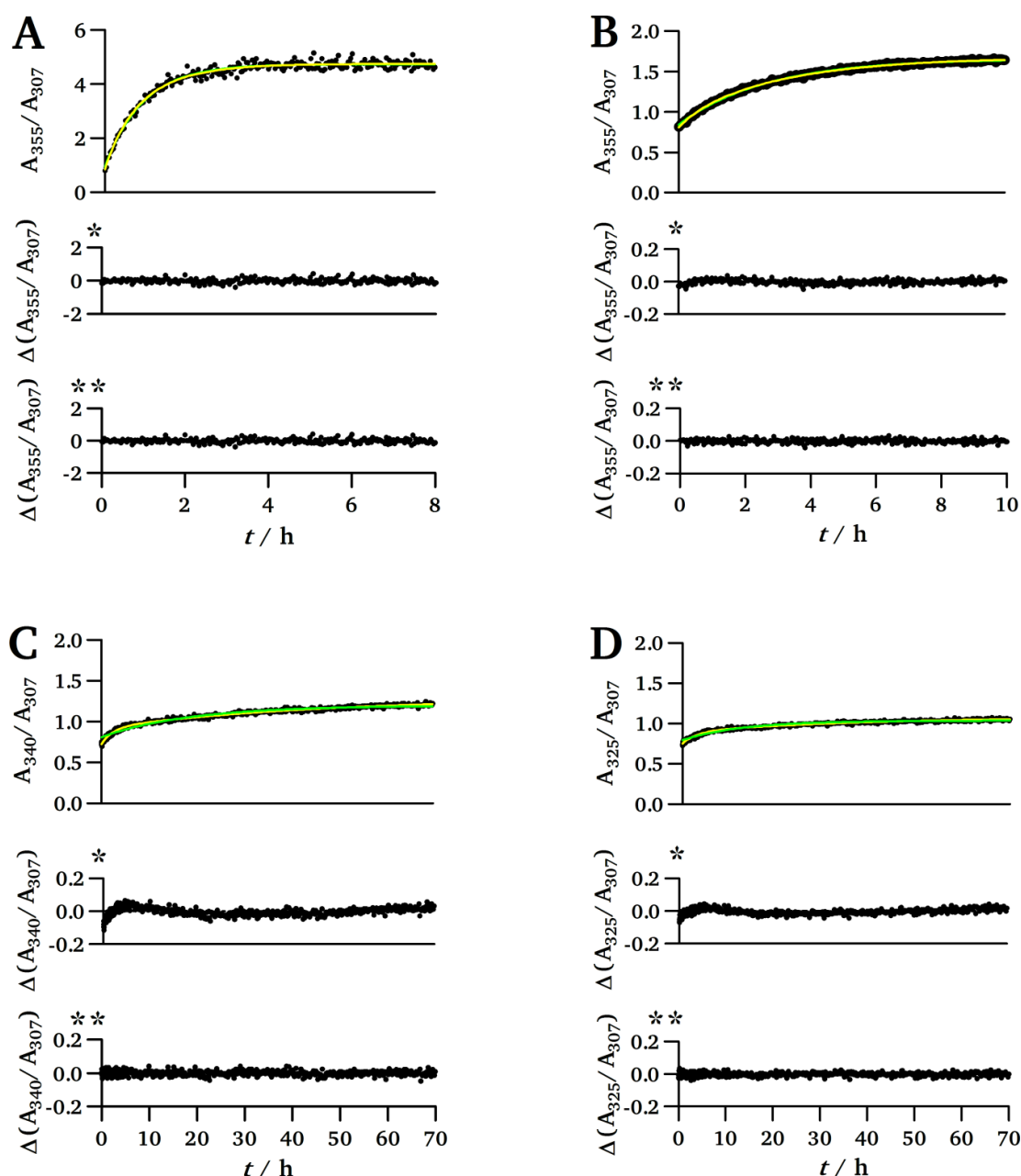
---

### 4.5.1. Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von 4-PAM und 4-PAM/HDAH-Konjugaten

---

In erster Instanz wurde das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten von 4-PAM sowie der beiden photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Konjugate M30C und S20C in MK-Puffer untersucht. Als Referenz wurde 4-PAM modifizierter HDAH-Wt verwendet, da dieser im Vergleich zur HDAH-Variante E340C (Tab. 14) keine signifikanten Einflüsse durch 4-PAM-Modifikation auf  $V_{\max}$ - oder  $K_m$ -Werte aufwies. Die 4-PAM-Modifikation von HDAH-Wt liegt, wie bereits erwähnt, fern des Aktivzentrums (Abb. 22 A). Das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten von ungebundenem 4-PAM (Abb. 28 A) sowie in konjugierter Form an HDAH-Wt (Abb. 28 B) an HDAH-Variante S20C (Abb. 28 C) und M30C (Abb. 28 D) wurde bei 30 °C über einen Zeitraum von bis zu 70 h untersucht. Zur Identifikation von Ein-Exponential- (\*) oder Zwei-Exponential Kinetiken (\*\*) wurden die jeweiligen Residuen mitaufgeführt (Abb. 28 A-D). Die kalkulierten Ratenkonstanten sowie relative Amplituden wurden in Tab. 15 zusammengefasst. Die Durchführung, Auswertung und Analyse der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationen erfolgte wie in Kap. 3.2.15.4 beschrieben.





**Abb. 28:** Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von 4-PAM sowie in konjugierter Form an HDAH-Wt, HDAH-Variante S20C und M30C. 8  $\mu$ M (A) ungebundenes 4-PAM, (B) 4-PAM/HDAH-Wt, (C) S20C und (D) M30C-Konjugate wurden durch UV-A Bestrahlung (Kap. 3.2.8.1) in die *cis*-Konfiguration überführt und anschließend die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von 4-PAM mit einem DAD-UV/Vis-Spektrophotometer in MK-Puffer bei 30 °C bis zu 70 h aufgenommen. Die im jeweiligen  $\lambda_{\text{max}}$  gemessenen Absorptionswerte wurden auf 307 nm normiert und die berechneten Verhältnisse gegen die entsprechende Messzeit in h aufgetragen. Grüne Linien repräsentieren Kurven einer nicht-linearen Regressionsanalyse eines Ein- sowie gelbe Linien eines Zwei-Exponential Modells. Residuen der analysierten Ein- (\*) oder Zwei- (\*\*) Exponential-Modelle. Die Messung, Auswertung und Analyse der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationen im Detail erfolgte wie beschrieben (Kap. 3.2.15.4). Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetik von ungebundenem 4-PAM (Abb. 28 A) zeigte ein unimolekulares Relaxationsverhalten in MK-Puffer, während für die 4-PAM/HDAH-Konjugat des Wt (Abb. 28 B) sowie der beiden Varianten S20C (Abb. 28 C) und M30C (Abb. 28 D) ein bimolekulares Verhalten identifiziert werden konnte. Eine Auswertung der drei untersuchten 4-PAM/HDAH-Konjugate mittels einem nicht-linearen, Ein-exponentiellen Regressionsmodell war nicht möglich. Die Residuen des Ein-Exponential Modells (Abb. 28 B/C/D, \*) zeigten im Vergleich zu dem Zwei-Exponential Modell (Abb. 28 B/C/D, \*\*) eine signifikant systematische Abweichung bezüglich der Basislinie, sodass die Annahme eines Ein-Exponential Modells für die untersuchten 4-PAM/HDAH Konjugate unwahrscheinlich und demzufolge ausgeschlossen wurde.

**Tab. 15: Ratenkonstanten und relative Amplituden thermischer *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von ungebundenem 4-PAM und in konjugierter Form an HDAH-Wt, S20C und M30C.** Die Messung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken sowie die Auswertung und Analyse kinetischer Parameter erfolgte wie in Kap. 3.2.15.4 beschrieben. Die Experimente wurden als unabhängige Dreifachbestimmungen bei 30 °C in MK-Puffer durchgeführt. Aufgeführte Werte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Analyse nach einem <sup>a</sup>Ein-Exponential Modell und <sup>b</sup>Zwei-Exponential Modell. <sup>c</sup>Ratenkonstante =  $k$ , <sup>d</sup>Ratenkonstante =  $k_{\text{fast}}$ , <sup>e</sup>Ratenkonstante =  $k_{\text{slow}}$ . Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Proben	Schnelle Ratenkonstante / ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Relative Amplitude / %	Langsame Ratenkonstante / ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Relative Amplitude / %
4-PAM (ungebunden) <sup>a</sup>	$1179.3 \pm 56.1^c$	-	-	-
4-PAM/HDAH-Wt <sup>b</sup>	$1059.9 \pm 81.5^d$	$21.1 \pm 2.2^d$	$251.8 \pm 26.4^e$	$78.9 \pm 2.2^e$
4-PAM/HDAH-S20C <sup>b</sup>	$409.6 \pm 4.9^d$	$29.8 \pm 3.9^d$	$24.1 \pm 2.1^e$	$70.2 \pm 3.9^e$
4-PAM/HDAH-M30C <sup>b</sup>	$479.5 \pm 72.6^d$	$40.7 \pm 1.6^d$	$23.5 \pm 3.7^e$	$59.3 \pm 1.6^e$

Anhand der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskonstanten konnte im Vergleich zu ungebundenem 4-PAM aufgezeigt werden, dass insbesondere das Relaxationsverhalten von konjugiertem 4-PAM an HDAH-Wt sowie den selektierten, photoschaltbaren HDAH-Varianten S20C und M30C erheblich verlangsamt wurde (Tab. 15). Bei Vergleich der unimolekularen Ratenkonstante ( $k$ ) von ungebundenem 4-PAM mit der schnellen bimolekularen Relaxationskonstante ( $k_{\text{fast}}$ ) des an HDAH-Wt konjugierten 4-PAM-Rests konnte ein ähnlich schnelles Relaxationsverhalten nachgewiesen werden. Für die photoschaltbaren HDAH-Varianten S20C und M30C konnte, mit Blick auf das Kontrollkonjugat (4-PAM/HDAH-Wt), eine 2.6-fache (S20C) und 2.2-fache (M30C) Verlangsamung der  $k_{\text{fast}}$ -Werte

gezeigt werden (Tab. 15). Eine weitaus stärkere Verlangsamung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation von konjugiertem 4-PAM konnte vor allem für die beiden genannten photoschaltbaren HDAH-Varianten anhand der langsamen Ratenkonstante ( $k_{\text{slow}}$ ) nachgewiesen werden. Verglichen mit dem 4-PAM/HDAH-Wt Konjugat ( $251.8 \pm 26.4 \cdot 10^{-3} / \text{h}$ ) wurde für 4-PAM/HDAH-S20C ( $24.1 \pm 2.1 \cdot 10^{-3} / \text{h}$ ) und M30C ( $23.5 \pm 3.7 \cdot 10^{-3} / \text{h}$ ) eine um  $\sim 11$ -fach erniedrigte Relaxation und bezüglich ungebundenem 4-PAM ( $1179.3 \pm 56.1 \cdot 10^{-3} / \text{h}$ ) ein um  $\sim 50$ -fach reduziertes *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten identifiziert. Bei den bimolekularen Relaxationskinetiken der 4-PAM/HDAH-Konjugate wurde insbesondere nachgewiesen, dass die relative Amplitude der langsameren Kinetik ( $k_{\text{slow}}$ ) den größten Anteil darstellte (HDAH-Wt > S20C > M30C, Tab. 15). Als Ursache für die nachgewiesenen, außerordentlich stark verlangsamten Relaxationskinetiken ( $k_{\text{slow}}$ -Werte) der beiden photoschaltbaren HDAH-Varianten, deren Halbwertszeiten auf  $\sim 30$  h (4-PAM/HDAH-M30C) und  $\sim 29$  h (4-PAM/HDAH-S20C) bestimmt werden konnten, wurde angenommen, dass die polare *cis*-Konfiguration oder der *cis*-*trans*-Übergangszustand durch intermolekulare Interaktionen mit nahe gelegenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche stabilisiert wird und dies zu den extrem verringerten Ratenkonstanten führte.

Darüber hinaus wurde nach Abschluss der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationen eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima des ungebundenen 4-PAM und des 4-PAM/HDAH-Wt Konjugats von 345 nm zu 355 nm sowie bei 4-PAM/HDAH-S20C von 330 nm zu 340 nm beobachtet. Die jeweilige beschriebene bathochrome Verschiebung kann reversibel durch Blaulichtbestrahlung aufgehoben werden. Für das 4-PAM/HDAH-M30C Konjugat wurde keine Rotverschiebung von  $\lambda_{\text{max}}$  nachgewiesen.

---

#### 4.5.2. MD-Simulationen

---

In zweiter Instanz wurde die hypothetisierte Stabilisierung der *cis*-4-PAM-Konfiguration bzw. des *cis*-*trans*-Übergangszustands an den Proteinoberflächen der photoschaltbaren HDAH-Varianten S20C und M30C näher untersucht. Hierbei wurde angenommen, dass die Stabilisierung der beiden zuvor genannten Zustände durch nicht-kovalente molekulare Interaktionen, vermittelt durch vereinzelte oder mehrere in Nachbarschaft gelegenen Aminosäuren, an der Proteinoberfläche verursacht wird. Diese Hypothese könnte eine Erklärung für die beobachtete, extrem verlangsamte *cis*-zu-*trans* Relaxation von konjugiertem 4-PAM an den HDAH-Varianten S20C und M30C darstellen. Um diesem Gedankenansatz weiter nachzugehen und gleichzeitig die experimentell erhobenen Daten zu dem verlangsamten thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten zu unterstützen, wurden MD-Simulationen von den photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Variant Konjugaten S20C und M30C durchgeführt. Die MD-

---

Simulation wurde eingesetzt, um im Detail mehr über den vorliegenden Photoschaltungsmechanismus zur Steuerung der reversiblen HDAH-Aktivität durch *cis/trans* Isomerisierung, zu erfahren und potentielle intermolekulare Interaktionen des angekoppelten 4-PAM-Rests mit der Proteinoberfläche vorherzusagen. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode auf atomarer und molekularer Ebene die potentielle *cis/trans*-4-PAM-Schaltungsmechanik visualisiert werden.

MD-Simulationen (Kap. 3.2.16) wurden für beide photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Variant Konjugate (S20C und M30C) jeweils in *cis*- und *trans*-Konfiguration mit dem Programm YASARA über 19 ns durchgeführt (Abb. 29 A1/B1). Darüber hinaus wurden nicht-kovalente, hydrophobe Interaktionen zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest und dem Proteinrückgrad (C-C<sub>α</sub>) sowie den C-Atomen nahe gelegener Aminosäuren (Tab. A. 3 & Tab. A. 4) durch C-C Kontaktanalyse vorhergesagt. Die Annotation der Aminosäuren-C-Atome ist in Abb. A. 5 abgebildet. Aminosäuren, für die C-C Kontakte mit *cis*-4-PAM von  $\geq 29$  % identifiziert wurden, sind farblich (Abb. 29 A2/B2) dargestellt. Zur Abschätzung der räumlichen Entfernung zwischen dem gekoppelten 4-PAM-Rest und dem Aktivzentrum wurden Distanzen zwischen dem *para*-Kohlenstoffatom der freien, endständigen Phenylgruppe von 4-PAM und dem katalytischen Zink-Ion berechnet (Abb. 29 A3/B3). Die Analyse und Kalkulation der zuvor beschriebenen Parameter erfolgte über eine Simulationszeit von 10 - 19 ns (Kap. 3.2.16).

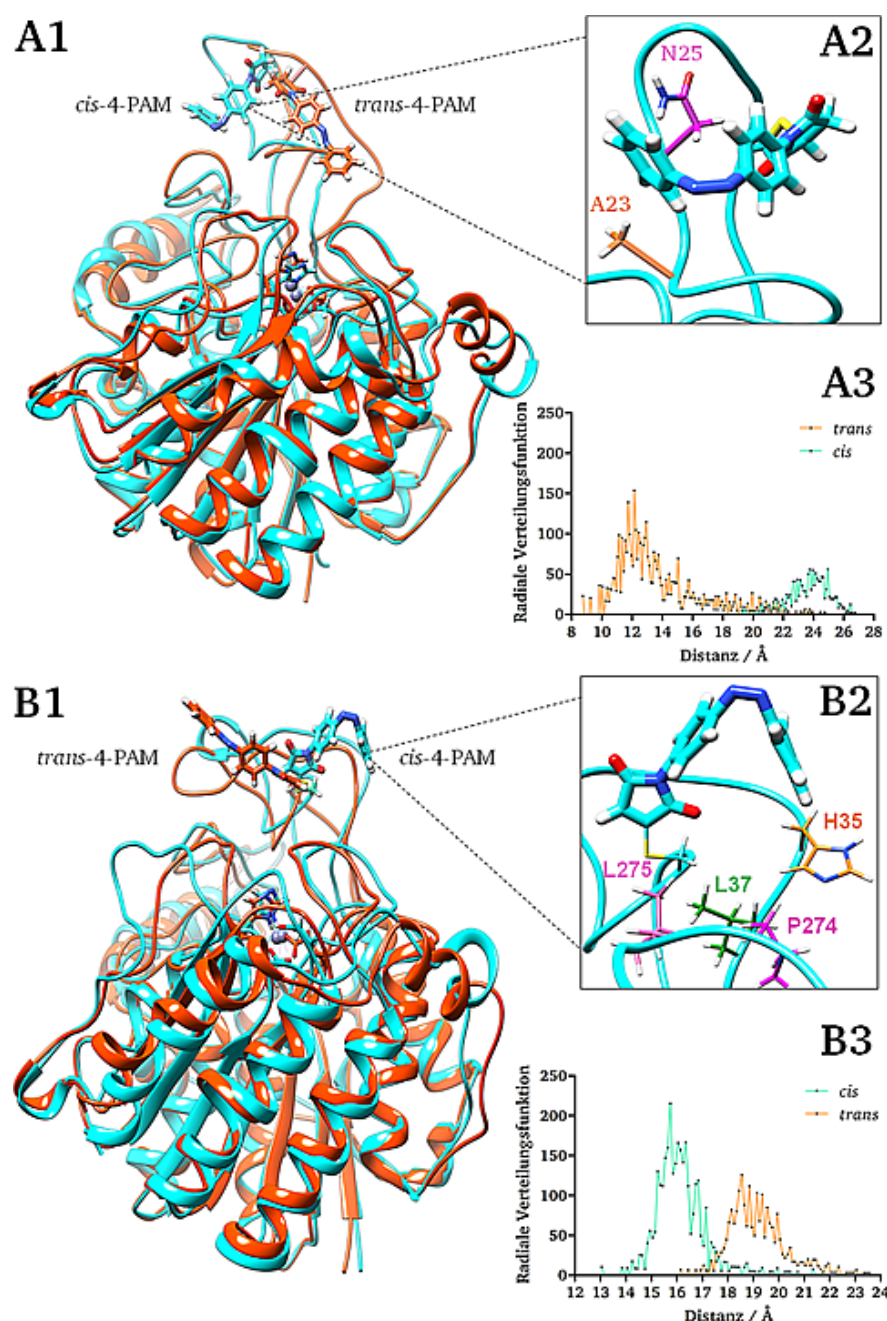


Abb. 29: MD-Simulationen der 4-PAM/HDAH-Konjugate M30C (A1) und S20C (B1) in *cis*- (türkis, *cis*-4-PAM) und in *trans*-Konfiguration (orange, *trans*-4-PAM) nach einer Simulationszeit von 19 ns. Das mittig gelegene Aktivzentrum ist durch das katalytische Zink-Ion (Zn<sup>2+</sup>, dunkelgraue Kugel) gekennzeichnet. Potentiell vorhergesagte Aminosäuren, die an molekularen Interaktionen zwischen dem kovalent angekoppelten 4-PAM-Rest in der *cis*-Konfiguration und der Proteinoberfläche beteiligt sein könnten, wurden jeweils farbig für das 4-PAM/HDAH-M30C (A2) und S20C Konjugat (B2) dargestellt. In A3 (4-PAM/M30C) und B3 (4-PAM/S20C) sind die jeweils berechneten Verteilungen, gemittelter Distanz zwischen dem aromatischen *para*-Kohlenstoffatom der freien, endständigen Phenylgruppe des 4-PAM-Rests und dem katalytischen Zink-Ion abgebildet. Die MD-Simulation und die Analyse der Atom-Trajektorien wurden wie in Kap. 3.2.16 beschrieben durchgeführt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

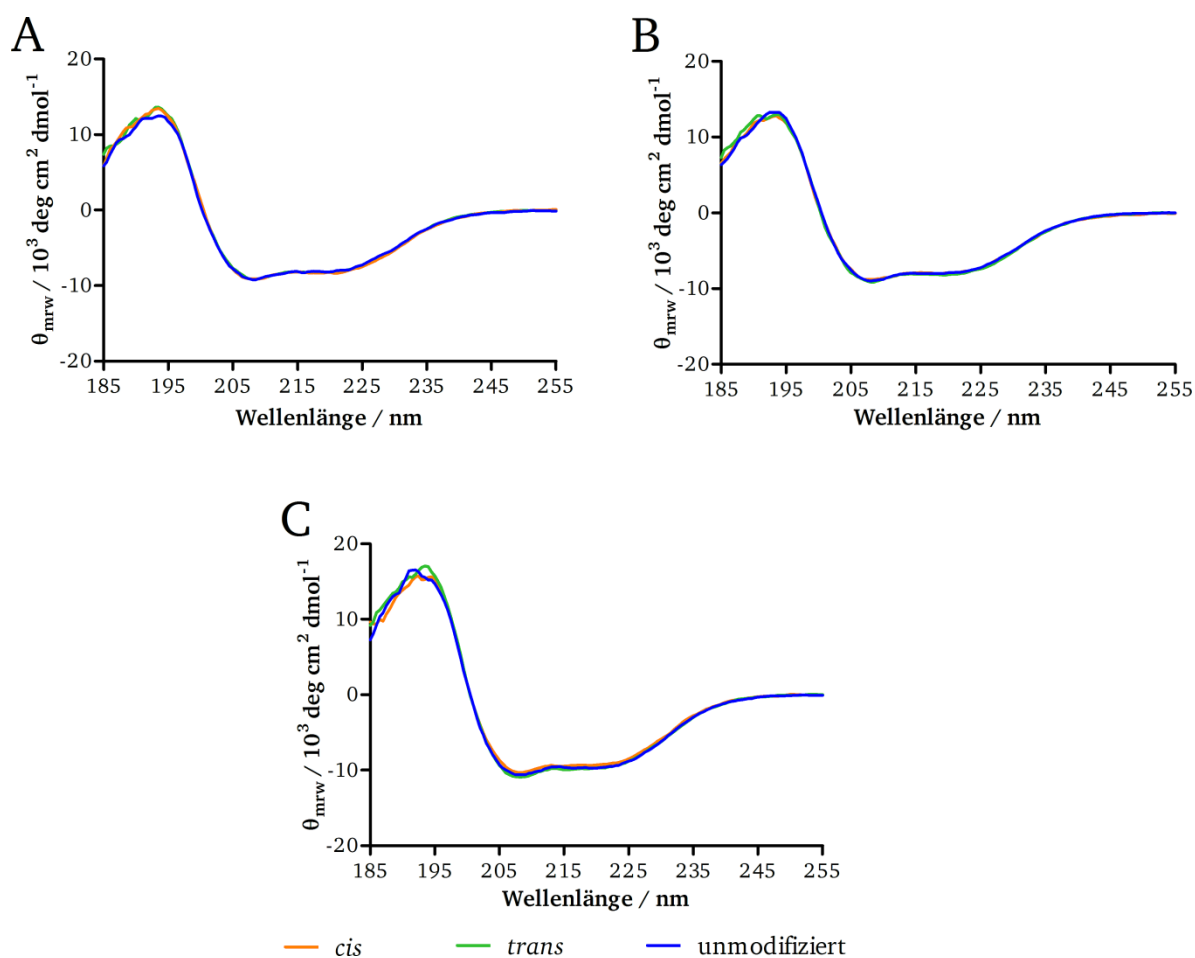
Für das 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat wurde ein Photoschaltungsmechanismus simuliert, bei dem das längenexpandierte *trans*-Isomer direkt in Richtung des katalytischen Zink-Ions ausgerichtet vorlag und demzufolge zu einer sterischen Blockierung des Aktivkanals führen könnte. Die gestauchte *cis*-Konfiguration hingegen nahm eine vom Aktivzentrum entfernte Orientierung ein (Abb. 29 A1). Des Weiteren wurde zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest in der *cis*-Konfiguration und in Nachbarschaft dazu gelegenen Aminosäuren prognostiziert, dass die Stabilisierung von 4-PAM hauptsächlich durch hydrophobe C-C Interaktionen sowie durch eine Wasserstoffbrückenbindung verursacht wurde (Abb. 29 A2). Hydrophobe Interaktionen wurden vor allem mit C-Atomen von N25 ( $C^\beta$  vs.  $C2_{4-PAM} = 91.3\%$  und  $C^\alpha$  vs.  $C13_{4-PAM} = 60.0\%$ ) und A23 ( $C^\beta$  vs.  $C14_{4-PAM} = 58.0\%$  und C vs.  $C14_{4-PAM} = 42.0\%$ , Tab. A. 3) identifiziert. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen N25 (Donor -NH, Peptidbindung) und der Maleimidgruppe von 4-PAM (Sauerstoffatom, fungierend als Akzeptor) konnte nahe der ausgebildeten Thioetherbindung an C30 mit einer Häufigkeit von 50.9 % vorhergesagt werden. Neben N25 und A23 konnten weitere Aminosäuren bestimmt werden, die allerdings geringere C-C Kontakte mit 4-PAM aufwiesen (z.B. A24 > D95 > A28 u.w., Tab. A. 3). Bei Betrachtung der kalkulierten, mittleren Distanzen zwischen dem endständigen aromatischen *para*-Kohlenstoffatom des angekoppelten 4-PAM-Rests und dem katalytischen Zink-Ion (Abb. 29 A3) konnte für die *trans*-Konfiguration (12.2 Å, orangene Linie) eine wesentlich kürzere Distanz als für das *cis*-Isomer (25.0 Å, türkise Linie) prognostiziert werden.

Während für das *trans*-Isomer des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats eine Ausrichtung zu dem Zink-Ion prognostiziert wurde, zeigten die beiden 4-PAM-Isomere des HDAH-S20C-Konjugats eine zu dem Zink-Ion entfernte und gleichzeitig zueinander entgegengesetzte Orientierung auf (Abb. 29 A1/B1). Bei dem 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat wurden mehrere Aminosäuren identifiziert, für die C-C Kontakte mit der *cis*-Konfiguration von 4-PAM von  $\geq 29\%$  nachgewiesen werden konnten. Als stärkste interagierende Aminosäure wurde H35 ( $C^\eta$  vs.  $C14_{4-PAM} = 53.3\%$ ,  $C^{\epsilon 1}$  vs.  $C14_{4-PAM} = 40.0\%$  und  $C^{\delta 2}$  vs.  $C14_{4-PAM} = 39.3\%$ ) identifiziert, gefolgt von P274 ( $C^\beta$  vs.  $C11_{4-PAM} = 46.0\%$  and  $C^\eta$  vs.  $C12_{4-PAM} = 31.3\%$ ), L37 ( $C^{\delta 1}$  vs.  $C6_{4-PAM} = 29.3\%$ ) und L275 ( $C^{\delta 2}$  vs.  $C6_{4-PAM} = 32.0\%$ ) (Abb. 29 B2). C-C Kontakte weiterer Aminosäuren, jedoch zu einem wesentlich geringeren Anteil, wurden in Tab. A. 4 aufgelistet (z.B. I33 > L21 > Q31). Eine zusätzliche Stabilisierung von *cis*-4-PAM durch Wasserstoffbrückenbindungen konnte nicht vorhergesagt werden. Die mittlere Distanz zwischen dem endständigen aromatischen *para*-Kohlenstoffatom des angekoppelten 4-PAM-Rests und dem katalytischen Zink-Ion betrug für das *trans*-Isomer 18.6 Å (orangene Linie) und für das *cis*-Isomer 15.8 Å (türkise Linie) (Abb. 29 B3).



### 4.5.3. Einflussnahme der *cis/trans*-Photoisomerisierung von 4-PAM auf Sekundärstrukturelemente von 4-PAM/HDAH-Konjugaten

Zur mechanistischen Untersuchung involvierter Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter oder Random Coil-Strukturen) in dem Photoschaltungsmechanismus der 4-PAM/HDAH-S20C und M30C Konjugate, hervorgerufen durch 4-PAM-Modifikation oder durch *cis/trans*-Photoisomerisierung des angekoppelten Azobenzolrests, wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (Kap. 3.2.14). Als Referenz wurden die dazugehörigen unmodifizierten HDAH-Varianten sowie das nicht-photoschaltbare 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat eingesetzt (Abb. 30).



**Abb. 30: CD-Spektren von unmodifizierten sowie 4-PAM-modifizierten HDAH Konjugaten.** Die 4-PAM/HDAH-Konjugate (A) S20C, (B) M30C und (C) Wt wurden wie in Kap. 3.2.10 beschrieben hergestellt (4 - 5  $\mu$ M) und gegen 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 7.2) dialysiert (Kap. 3.2.12). Die 4-PAM-Modifikation wurde in die *cis*- (UV-A, orangene Linie) sowie *trans*-Konfiguration (Blaulicht, grüne Linie) überführt (Kap. 3.2.8.1) und ergänzend dazu CD-Spektren (Kap. 3.2.14) der jeweils unmodifizierten HDAH-Varianten (blaune Linie) aufgenommen. Die kalkulierten mittleren Elliptizitäten pro Aminosäurerest ( $\theta_{\text{mrw}} = 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ) wurden gegen die entsprechende Wellenlänge (nm) aufgetragen. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

Die CD-Spektren der jeweils unmodifizierten HDAH-Varianten zeigten im Vergleich zu den 4-PAM/HDAH-Konjugaten S20C (Abb. 30 A), M30C (Abb. 30 B) und Wt (Abb. 30 C) in *cis*- als auch in *trans*-Konfiguration keine signifikanten Änderungen der Elliptizität. Eine Beteiligung von Sekundärstrukturelementen, deren Konformation durch die 4-PAM-Modifikation selbst als auch reversibel durch *cis/trans* Isomerisierung von 4-PAM verändert wurde, konnte demzufolge ausgeschlossen werden. Dass die *cis/trans*-Isomerisierung von 4-PAM allerdings die Ausrichtung angrenzender Aminosäuren beeinflusst haben könnte, konnte durch die CD-spektroskopische Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Generell wurde für die in Abb. 30 A-C dargestellten CD-Spektren ein distinktes und für  $\alpha$ -Helices charakteristisches Minimum bei ca. 208 nm sowie ein Maximum bei ca. 194 nm identifiziert. Ein weiteres, für  $\beta$ -Faltblätter charakteristisches Minimum im Bereich von ca. 215 - 225 nm konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

---

#### 4.5.4. Untersuchung der *cis*-4-PAM-Konfigurationsstabilisierung sowie den Photoschaltungsmechanismus

---

Inhalte dieses Kapitels wurden publiziert, Korbus *et al.*<sup>139</sup>

Für eine genauere Untersuchung der vermittelnden Effekte, die für eine starke Verlangsamung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von den 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten S20C und M30C verantwortlich sein könnten (Kap. 4.5.1), wurden weitere Experimente auf Basis der erhobenen MD-Simulationsdaten (Kap. 4.5.2) durchgeführt. Die vorhergesagten hydrophoben C-C Interaktionen zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest in *cis*-Konfiguration und den in Nachbarschaft angrenzenden Aminosäuren von den HDAH-Varianten M30C und S20C wurden genutzt, um mögliche intermolekulare Interaktionen zwischen den beiden genannten Partnern zu identifizieren und damit das Zustandekommen der außergewöhnlich langen Stabilisierung des *cis*-4-PAM-Rests an der HDAH-Proteinoberfläche aufzuklären. Für die Charakterisierung potentieller intermolekularer Interaktionen wurde das 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat verwendet. Dieses besaß, im Vergleich zu dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat, eine divergentere Auswahl an möglich involvierten Aminosäuren (vgl. Tab. A. 3 & Tab. A. 4). Des Weiteren wurde am photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat Modell der vorherrschende Photoschaltungsmechanismus näher untersucht. Diesbezüglich wurden C-C Interaktionsdaten zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest in *trans*-Konfiguration und nahe gelegenen Aminosäuren miteinbezogen (Tab. A. 5).



#### 4.5.4.1. Selektion von potentiell interagierenden Aminosäuren

Wie bereits in Kap. 4.5.2 erwähnt, konnten durch MD-Simulationen von dem 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat in *cis*- und *trans*-Konfiguration (Abb. 31 A) C-C-Kontakte zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest und Aminosäuren analysiert werden, die an intermolekularen Interaktionen beteiligt sein könnten. Als Aminosäuren, für die eine Interaktion mit *cis*-4-PAM vorhergesagt wurden, konnten H35 > P274 > L275 > L37 (Abb. 31 B) identifiziert werden. Bezugnehmend auf Interaktionen mit der *trans*-Konfiguration wurden die Aminosäuren Q31 > F208 > R29 > L275 prognostiziert (Abb. 31 C).

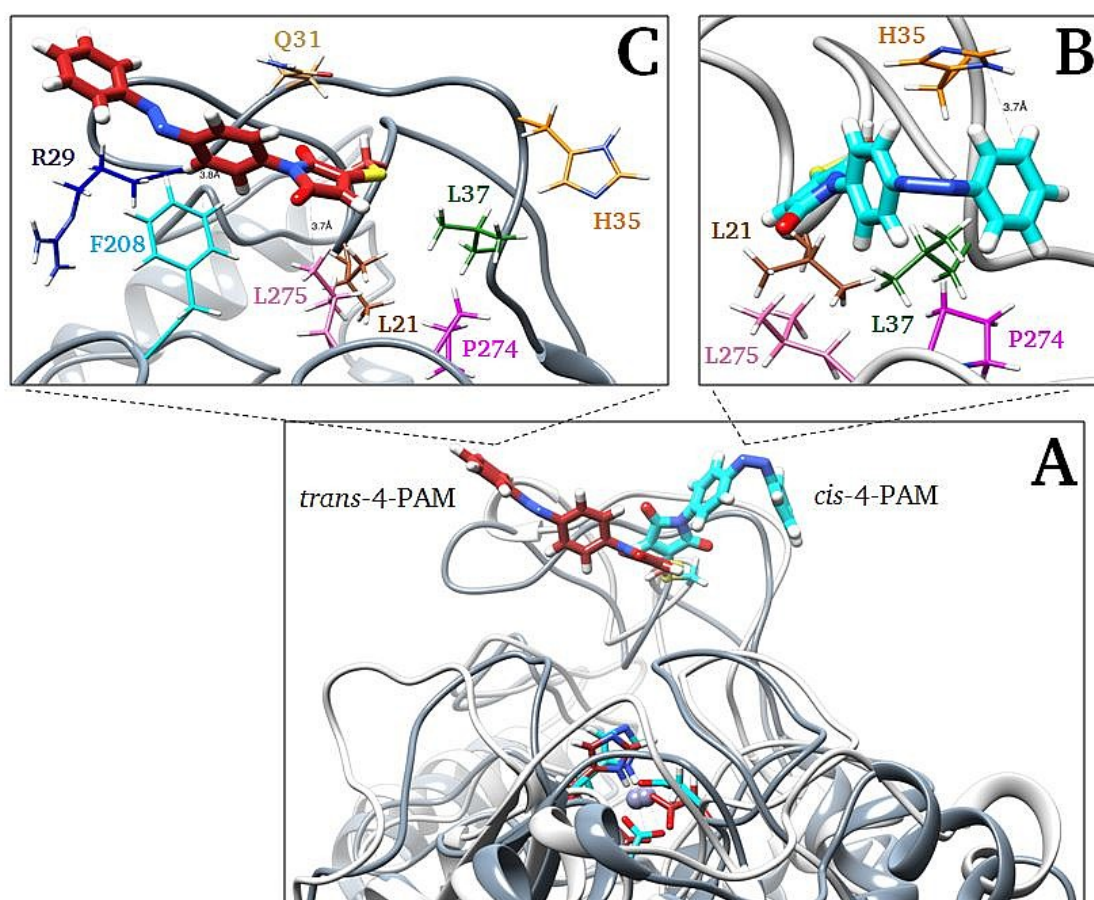


Abb. 31: MD-Simulation vorhergesagter Aminosäuren für die HDAH-Variante S20C, die an intermolekularen Interaktionen mit dem angekoppelten 4-PAM-Rest in *cis*- und in *trans*-Konfiguration beteiligt sind. (A) MD-Simulation des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats in dessen *cis*- (Proteinstruktur: leicht grau, *cis*-4-PAM: türkis) und *trans*-Konfiguration (Proteinstruktur: dunkel grau, *trans*-4-PAM: rot) nach 19 ns. Das relativ mittig gelegene Aktivzentrum ist durch das positiv geladene, katalytische Zink-Ion ( $\text{Zn}^{2+}$ , graue Kugeln) dargestellt, welches koordinativ durch zwei Aspartatreste (D180 und D268) und ein Histidin (H182) gebunden wird. Detailansicht prognostizierter Aminosäuren von HDAH-S20C, die potentiell mit (B) *cis*-4-PAM (türkis) und (C) *trans*-4-PAM (rot) interagieren. Die MD-Simulation und Analyse der C-C Kontakte wurde wie in Kap. 3.2.16 beschrieben durchgeführt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

Zur Charakterisierung von verschiedenen möglichen intermolekularen Wechselwirkungen mit *cis*-4-PAM wurde eine systematische, ortsspezifische Mutagenese von den in Abb. 31 B dargestellten Aminosäuren durchgeführt. Für die Identifizierung polarer Interaktionen (Dipol-Dipol) wurde Serin (S), für hydrophobe Interaktionen Alanin (A), zur Kombination der beiden zuletzt genannten Eigenschaften Threonin (T) und zur Verifizierung möglicher Abstoßungsreaktionen gleicher Ladungen, Aspartat (D) als Substituent eingesetzt. Die für diese Mutagenese-Studie generierten HDAH-S20C Varianten wurden in Tab. 16 zusammengefasst. Zur bestmöglichen Nachahmung der hydrophoben Eigenschaften von Prolin (P) sowie die Möglichkeit polare Interaktionen mit *cis*-4-PAM untersuchen zu können, wurde P274 durch T ersetzt.

**Tab. 16: Aminosäuresubstitution von HDAH-S20C selektierten Aminosäuren durch ortsspezifische Mutagenese.** Die ortsspezifische Mutagenese (Kap. 3.1.5.1) wurde mit den in Tab. 3 aufgelisteten Mutagenese-Primern durchgeführt. Die Auflistung der Aminosäuren richtet sich nach der höchsten bis zur niedrigsten vorhergesagten Interaktionswahrscheinlichkeit mit 4-PAM (Tab. A. 4). Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

Selektierte Aminosäuren	Aminosäuresubstitution
H35	D / S
P274	T / S
L37	A / S
L275	A / S
L21	A / S
L21/L275	A / S

Aufgrund der Annahme, dass die Aminosäuren L21 und L275 eine hydrophob-basierte Brückenstruktur ausbilden könnten (Abb. 31 B), welche für die Interaktion mit *cis*-4-PAM sowie bei dem Photoschaltungsmechanismus eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde L21 trotz gering berechneter C-C Kontakte (Tab. A. 4) in die Mutagenese-Studie miteinbezogen. In diesem Zusammenhang wurden Doppelmutanten von L21 und L275 hergestellt (Tab. 16). Alle in Tab. 16 aufgeführten HDAH-S20C-Varianten wurden rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL exprimiert (Kap. 3.2.3), konzentriert (Kap. 3.2.5) und 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugate hergestellt (Kap. 3.2.10).

#### 4.5.4.2. Charakterisierung des Photoschaltungsmechanismus in Abhängigkeit definierter Aminosäuresubstitutionen

Zur Untersuchung des Aminosäuresubstitutions-abhängigen Einflusses auf die Photoschaltungseffizienz der HDAH-S20C Enzymaktivität sowie auf mögliche Konformationsänderungen wurden Michaelis-Menten Kinetiken (Kap. 3.2.13.2) durchgeführt. Hierbei wurden jeweils die unmodifizierten und 4-PAM-modifizierten HDAH-S20C-Varianten untersucht und die davon abgeleiteten Michaelis-Menten Parameter ( $V_{\max}$  und  $K_m$ ) in Tab. 17 zusammengefasst. Für eine bessere Lesbarkeit des folgenden Textes wurde das Vorhandensein der S20C-Mutation in den HDAH-Varianten (Tab. 16) nicht weiter erwähnt, sondern nach der zuletzt eingeführten Mutation benannt. Die Bestimmung der Photoschaltungseffizienz sowie die Identifizierung von signifikant photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Konjugaten, erfolgte nach zuvor definierten Kriterien (Kap. 3.2.13.3).

Anhand der Mutagenese-Studie konnte gezeigt werden, dass die Photoschaltung der Enzymaktivitäten ( $V_{\max}$ -Werte) nur bei drei 4-PAM/HDAH-Konjugaten (L21A, H35S und L37A) weiter aufrechterhalten werden konnte. Das *cis*-Isomer konnte generell als die aktivere Form und das *trans*-Isomer als die inaktivere Form identifiziert werden, wie es auch bei den anderen photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Konjugaten nachgewiesen wurde (Tab. 14). Für die 4-PAM/HDAH-Konjugate H35S und L37A konnten jeweils gleiche Photoschaltungseffizienzen bestimmt werden (34 %, Tab. 17), ähnlich dem Maximalwert des ursprünglichen 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats (40 %, Tab. 14). Trotz der nachgewiesenen, leichten Reduzierung der Photoschaltungseffizienz um 6 % zeigte die unmodifizierte HDAH-L37A im Vergleich zu HDAH-S20C eine um 79 % erniedrigte Enzymaktivität sowie eine verminderte Substrataffinität ( $K_m$ -Wert) (Tab. 17). Aufgrund der relativ starken Reduzierung beider zuletzt genannten Parameter wurde angenommen, dass bei HDAH-L37A eine maßgebliche Änderung in der Proteinstruktur stattfand und demnach, eine Unterscheidung, ob HDAH-L37A weiterhin im Photoschaltungsmechanismus bzw. an einer Interaktion mit *cis*-4-PAM beteiligt war, nicht genau möglich. Nichtsdestotrotz führte eine Verkürzung des hydrophoben Rests von L37 zu A zu einer starken Verminderung des  $V_{\max}$ -Werts und damit zur Annahme, dass L37 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Proteinkonformation und damit zur Gewährleistung der ursprünglichen HDAH-S20C Aktivität sowie der maximalen Photoschaltungseffizienz einnimmt. Für die polare S-Substitution von L37, welche im Vergleich zu HDAH-L37A eine um 2.5-fach gesteigerte Enzymaktivität aufwies, konnte keine Photoschaltung mehr nachgewiesen werden (Tab. 17).

**Tab. 17:  $V_{\max}$  and  $K_m$  Werte von 4-PAM-modifizierten und unmodifizierten HDAH-S20C-Varianten.** Die HDAH-S20C-Variant-Konjugate wurden mit 4-PAM modifiziert, mit UV-A (*cis*-Konfiguration) oder Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt und Michaelis-Menten Kinetiken aufgenommen (Kap. 3.2.13.2). Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  angegeben und einer statistischen Analyse unterzogen (Einfach-ANOVA und Bonferroni post-hoc Test). <sup>a</sup>P < 0.05 (*cis*-4-PAM vs. *trans*-4-PAM), <sup>b</sup>P < 0.05 (unmodifiziert vs. *cis*-4-PAM), <sup>c</sup>P < 0.05 (unmodifiziert vs. *trans*-4-PAM). \* =  $V_{\max}$  photoschaltbares 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugat (rot markiert). # = Referenzvariante HDAH-S20C. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

	$V_{\max} / (\text{nM s}^{-1})$		$K_{\text{m}} / \mu\text{M}$			
HDAH-Varianten	unmodifiziert	4-PAM modifiziert		unmodifiziert	4-PAM modifiziert	
		<i>cis</i>	<i>trans</i>		<i>cis</i>	<i>trans</i>
S20C <sup>*,#</sup>	7.59 ± 0.39	5.42 ± 0.10 <sup>a,b</sup>	3.27 ± 0.08 <sup>a,c</sup>	47.6 ± 0.7	74.3 ± 5.5 <sup>b</sup>	79.5 ± 5.9 <sup>c</sup>
L21A <sup>*</sup>	9.92 ± 0.28	5.88 ± 0.18 <sup>a,b</sup>	4.76 ± 0.22 <sup>a,c</sup>	44.0 ± 2.5	55.1 ± 6.7	65.8 ± 11.2
L21S	7.76 ± 0.52	5.32 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.42 ± 0.07 <sup>c</sup>	61.7 ± 1.1	50.9 ± 0.4	62.0 ± 0.6
H35D	2.06 ± 0.09	1.43 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.02 <sup>c</sup>	97.4 ± 13.8	84.3 ± 9.8	110.7 ± 13.9
H35S <sup>*</sup>	6.30 ± 0.20	3.41 ± 0.05 <sup>a,b</sup>	2.24 ± 0.01 <sup>a,c</sup>	87.9 ± 3.1	77.0 ± 5.9	85.3 ± 6.1
L37A <sup>*</sup>	1.59 ± 0.10	1.31 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>a,c</sup>	74.9 ± 3.4	88.0 ± 3.8	109.0 ± 12.8
L37S	4.02 ± 0.51	2.89 ± 0.35	2.33 ± 0.22	60.1 ± 4.7	57.5 ± 3.1	80.4 ± 11.0
P274S	6.44 ± 0.32	2.72 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.03 <sup>c</sup>	65.3 ± 6.1	68.2 ± 0.4	76.3 ± 6.8
P274T	6.28 ± 0.20	3.39 ± 0.29 <sup>b</sup>	3.49 ± 0.39 <sup>c</sup>	47.9 ± 2.5	50.3 ± 1.6	59.3 ± 4.3
L275A	3.26 ± 0.11	1.37 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.01 <sup>c</sup>	28.7 ± 1.0	61.5 ± 3.8 <sup>b</sup>	70.9 ± 4.9 <sup>c</sup>
L275S	1.09 ± 0.004	0.57 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>c</sup>	31.8 ± 2.2	59.8 ± 3.2 <sup>b</sup>	80.2 ± 4.4 <sup>c</sup>
L21A/L275A	4.05 ± 0.05	3.13 ± 0.11 <sup>b</sup>	3.31 ± 0.29 <sup>c</sup>	24.5 ± 2.6	37.8 ± 4.1	29.9 ± 2.8
L21S/L275S	1.34 ± 0.01	0.90 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.10 <sup>c</sup>	29.5 ± 0.9	46.4 ± 2.2 <sup>b</sup>	50.2 ± 2.0 <sup>c</sup>

Durch die H35S-Substitution wurde die Enzymaktivität der HDAH-S20C-Variante nur geringfügig vermindert (17 %), allerdings ein gesteigerter  $K_m$ -Wert nachgewiesen (Tab. 17). Durch Aminosäuresubstitution hervorgerufene Konformationsänderungen wurden erst dann in Betracht gezogen, wenn zusätzlich zu einem gesteigerten  $K_m$ -Wert, auch der  $V_{\max}$ -Werte der jeweils untersuchten HDAH-Variante stark reduziert wurde. Im Falle der HDAH-H35S-Variante wurde daher angenommen, dass die Proteinkonformation durch die Mutation nur geringfügig beeinflusst wurde und

daraus die um 6 % erniedrigte Photoschaltungseffizienz für das 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugat resultierte (vgl. mit 4-PAM/HDAH-S20C, 40 %, Tab. 14). Aufgrund der fast vollständig beibehaltenen Photoschaltungseffizienz des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats stellte H35 kein wichtiges Glied in dem Photoschaltungsmechanismus dar, aber möglicherweise bei der intermolekularen Interaktion mit dem polaren *cis*-4-PAM-Rest. Eine Substitution von H35 durch D führte zu einer um 73 % erniedrigten Enzymaktivität sowie Substrataffinität und demnach zu einer vermuteten Konformationsänderung der HDAH-H35D-Variante (Tab. 17).

Bezugnehmend auf die Aminosäuresubstitution von L21 konnte nachgewiesen werden, dass eine Verkürzung des aliphatischen Rests von L21 zu A in einer Abnahme der Photoschaltungseffizienz resultierte. Verglichen mit der für das 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat bestimmten Photoschaltungseffizienz (40 %) konnte die Enzymaktivität des 4-PAM/HDAH-L21A-Konjugats nur noch um 19 % geschaltet werden (Tab. 17). Aufgrund der Tatsache dass die Mutagenese von L21 zu A, verglichen mit HDAH-S20C, zu keiner Verminderung der Enzymaktivität führte und eine gleichbleibende Substrataffinität gemessen wurde, konnte als Ursache für die Abnahme der Photoschaltungseffizienz die Verkürzung des aliphatischen Rest nachgewiesen werden. L21 wurde demzufolge als wichtige Determinante innerhalb des Photoschaltungsmechanismus identifiziert und war damit essentiell für die Aufrechterhaltung der maximalen Photoschaltungsleistungsfähigkeit (40 %). Eine Substitution von L21 zu S eliminierte die Photoschaltungsfähigkeit bei trotz gleichbleibender Enzymaktivität und nahezu ähnlicher Substrataffinität (vgl. zu HDAH S20C, Tab. 14).

Die an P274 (HDAH-Varianten P274T/S) durchgeführten Aminosäuresubstitutionen führten vergleichsweise zu HDAH-S20C zu keiner erheblichen Reduktion der Enzymaktivität sowie der Substrataffinität (vgl. Tab. 17). Obwohl beide Parameter für eine nahezu unbeeinträchtigte Proteinkonformation sprechen und damit eine Beteiligung von P274 innerhalb des Photoschaltungsmechanismus abgeleitet werden könnte, war keine Photoschaltung der Enzymaktivitäten von den HDAH-Varianten P274T/S nachweisbar. Der Grund hierfür könnte der durch Prolin vermittelte Torsionswinkel im Proteinrückgrad sein, der allgemein bekannt als Helixbrecher fungiert. Durch die Substitution von P274 durch T oder S und der damit verbundenen Torsionswinkeländerungen konnten keine intermolekularen Interaktionen mit *cis*-4-PAM ausgebildet und infolgedessen keine Photoschaltung beobachtet werden. P274 wurde demnach eine wichtige Rolle in dem Photoschaltungsmechanismus zugeschrieben, welche maßgeblich an der Konservierung der für die Photoschaltung notwendige räumliche Ausrichtung der Proteinstruktur beteiligt ist.

Anhand der an L275 systematisch durchgeführten Mutagenese konnte festgestellt werden, dass bereits die Reduzierung des aliphatischen Rests von L275 zu A (HDAH-L275A) zu einem Verlust der ursprünglichen HDAH-S20C Aktivität um 56 % führte und dies in erhöhtem Maße durch die Substitution des polaren S (HDAH-L275S) gesteigert wurde (86 %). Trotz HDAH-S20C ähnlicher  $K_m$ -Werte (Tab. 14) wurde aufgrund der einschneidenden Enzymaktivitätsverluste für beide genannten HDAH-Varianten eine Konformationsänderung der Proteinstruktur angenommen (Tab. 17). Die für L275 nachgewiesene charakteristische Erniedrigung der Enzymaktivität in Abhängigkeit des aliphatischen Rests (L275A) sowie der starken Verminderung durch die S-Substitution (L275S) unterstützt die anfängliche Hypothese, dass L275 an der Ausbildung einer zwischen L275 und L21 bestehenden hydrophob-basierten Brückenstruktur beteiligt ist (Abb. 31 B/C). Da bei dem 4-PAM/HDAH-L21A-Konjugat weiterhin eine Photoschaltung der Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, wurde für L275 angenommen, dass insbesondere diese Aminosäure an dem Photoschaltungsmechanismus beteiligt und darüber hinaus für die Beibehaltung der maximalen Photoschaltungseffizienz verantwortlich ist. Da sich L275 in nächster Nähe zu dem Aktivzentrum befindet, ist die Aminosäure auch zusätzlich wichtig in der Aufrechterhaltung der ursprünglichen HDAH-S20C Proteinkonformation und schlussendlich für die Photoschaltung.

Wie bereits im Einzelnen für die beiden HDAH-Varianten L21 und L275 beschrieben, wurde bei beiden L-Doppelmutanten (HDAH-L21A/L275A und L21S/L275S) keine Photoschaltung der Enzymaktivität nachgewiesen. Die Verkürzung der aliphatischen Reste beider Leucine durch A-Substitutionen (L21A/L275A) führte zu einer Erniedrigung der HDAH-S20C Aktivität um 47 %, während insbesondere die S-Substitutionen (L21S/L275S) eine stärkere Erniedrigung der HDAH-S20C Aktivität verursachten (82 %, Tab. 17). Bei Vergleich der durch die Aminosäuresubstitutionen (A und S) herbeigeführten Effekte von L21 und L275 auf die HDAH-S20C-Aktivität konnten maßgebend Veränderungen an L275 für die Abnahme der HDAH-S20C Aktivität identifiziert werden. Dieses Resultat bestätigte die gemessenen Daten zu den jeweils einzelnen Leucinen (L21 und L275) und unterstreicht die Wichtigkeit von L275 als Glied in dem Photoschaltungsmechanismus und der damit verbundenen Photoschaltungseffizienz der 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat Aktivität durch *cis/trans* Isomerisierung (Abb. 31 B/C).

Bezugnehmend auf die Photoschaltbarkeit konnte generell festgestellt werden, dass mit der Änderung der Hydrophobizität bei den untersuchten Aminosäuren L21, L37, P274 und L275 (Abb. 31 B), besonders durch Substitution mit dem polaren S, ein vollständiger Verlust der Photoschaltbarkeit verbunden war (Tab. 17).



Für das vollständige Verständnis des vorliegenden Photoschaltungsmechanismus war neben der hauptsächlich beschriebenen und forcierten Aufklärung der aktivierenden *cis*-4-PAM basierten Photoschaltung auch Kenntniss über die inaktivierend wirkende, *trans*-4-PAM vermittelte Schaltung erforderlich. Hierbei ist wichtig, dass auch das *trans*-Isomer an der HDAH-S20C Proteinoberfläche in einer reversiblen Art und Weise fixiert werden kann. Anhand von MD-Simulationsdaten und C-C Kontaktanalyse zwischen dem an HDAH-S20C angekoppelten *trans*-4-PAM-Rest und den in Nachbarschaft dazu gelegenen Aminosäuren konnten potentielle Aminosäuren prognostiziert werden, die an der Fixierung von *trans*-4-PAM involviert sind (Tab. A. 5). Neben einer Vorhersage von möglichen Interaktionen mit dem *trans*-4-PAM-Rest und den C-Atomen der vier potentiellsten Aminosäuren (Q31 > F208 > R29 > L275, Abb. 31 C) wurde zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Q31 (Donor -NH, Peptidbindung) und der Maleimidgruppe von *trans*-4-PAM (Sauerstoffatom, fungierend als Akzeptor), nahe der ausgebildeten Thioetherbindung an C20, mit einer Häufigkeit von 61.8 % vorhergesagt. Aufgrund des vergleichsweise zu F208 und R29 höher prognostizierten einzelnen C-C Kontakts von L275 ( $C^{\delta 2}$  vs.  $C7_{4-PAM} = 38.7 \%$ , Tab. A. 5) wurde ergänzend zu der erwähnten Wasserstoffbrückenbindung angenommen, dass die Interaktion von L275 mit der Maleimidgruppe des angekoppelten 4-PAM-Rests die *trans*-Konfiguration zusätzlich stabilisiert und dadurch eine Rotation um die Thioetherbindung eingeschränkt wird. Für eine räumliche Fixierung in der längenexpandierten *trans*-Konfiguration wurden hydrophobe Interaktionen zwischen der Phenylgruppe von 4-PAM und der Phenylgruppe von F208 angenommen.

---

#### 4.5.4.3. Einflussnahme der Aminosäuresubstitution auf das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats

---

Wie bereits in Kap. 4.5.4.2 beschrieben, wurde das stark verlangsamte thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten von 4-PAM in Abhängigkeit selektierter Aminosäuren an der HDAH-S20C Proteinoberfläche (Abb. 31 B) durch systematische Mutagenese untersucht. Durch Substitution von Aminosäuren mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften (Tab. 16) wurden intermolekulare Interaktionen im Ausschlussprinzip, die an der Stabilisierung von *cis*-4-PAM beteiligt sein könnten, verifiziert. Bei dem Nachweis eines zweiphasigen Relaxationsverhaltens wären intermolekulare Interaktionen zwischen 4-PAM und Aminosäuren vorhanden, während ein einphasiges Relaxationsverhalten für keine Interaktion sprechen würde.

Die thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken der 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugate wurden wie in Kap. 3.2.15.4 beschrieben durchgeführt und die kinetischen Parameter in Tab. 18 zusammengefasst.

**Tab. 18: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf kinetische Parameter der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation von 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugaten.** Die thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken sowie dessen Analyse erfolgten wurde wie in Kap. 3.2.15.4 beschrieben. Die Experimente wurden als unabhängige Dreifachbestimmungen bei 30 °C ausgeführt. Dargestellte Werte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Analyse nach einem <sup>a</sup>Ein-Exponential und <sup>b</sup>Zwei-Exponential Modell. <sup>c</sup>Ratenkonstante =  $k$ , <sup>d</sup>Ratenkonstante =  $k_{\text{fast}}$ , <sup>e</sup>Ratenkonstante =  $k_{\text{slow}}$ , <sup>f</sup>Halbwertszeit =  $\ln(2)/k$ , <sup>g</sup>Halbwertszeit =  $\ln(2)/k_{\text{slow}}$ . <sup>#</sup> = Referenzvariante 4-PAM/HDAH-S20C. Zweiphasiges Relaxationsverhalten = grün umrahmt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

4-PAM/HDAH-Varianten	Schnelle Ratenkonstante / ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Langsame Ratenkonstante / ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Halbwertszeit / ( $10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )	Relative Amplitude / %
<b>S20C<sup>b,#</sup></b>	$409.6 \pm 4.9^{\text{d}}$	$24.1 \pm 2.1^{\text{e}}$	$28.7 \pm 2.5^{\text{g}}$	$29.8 \pm 3.9^{\text{d}}$ / $70.2 \pm 3.9^{\text{e}}$
L21A <sup>a</sup>	$257.4 \pm 49.3^{\text{c}}$	-	$2.7 \pm 0.5^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L21S <sup>a</sup>	$343.7 \pm 99.4^{\text{c}}$	-	$2.0 \pm 0.6^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
H35D <sup>a</sup>	$267.2 \pm 22.0^{\text{c}}$	-	$2.6 \pm 0.2^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
<b>H35S<sup>b</sup></b>	$433.5 \pm 42.7^{\text{d}}$	$54.1 \pm 2.8^{\text{e}}$	$12.8 \pm 0.7^{\text{g}}$	$40.3 \pm 0.7^{\text{d}}$ / $59.7 \pm 0.7^{\text{e}}$
L37A <sup>a</sup>	$301.1 \pm 24.4^{\text{c}}$	-	$2.3 \pm 0.2^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L37S <sup>a</sup>	$586.5 \pm 98.6^{\text{c}}$	-	$1.2 \pm 0.2^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
P274S <sup>a</sup>	$279.9 \pm 28.3^{\text{c}}$	-	$2.5 \pm 0.3^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
P274T <sup>a</sup>	$212.7 \pm 8.9^{\text{c}}$	-	$3.3 \pm 0.1^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L275A <sup>a</sup>	$201.5 \pm 13.4^{\text{c}}$	-	$3.4 \pm 0.2^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L275S <sup>a</sup>	$271.8 \pm 17.4^{\text{c}}$	-	$2.6 \pm 0.2^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L21A/L275A <sup>a</sup>	$406.3 \pm 16.2^{\text{c}}$	-	$1.7 \pm 0.1^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>
L21S/L275S <sup>a</sup>	$494.0 \pm 51.0^{\text{c}}$	-	$1.4 \pm 0.1^{\text{f}}$	100 <sup>c</sup>

Durch die systematische Mutagenese konnte gezeigt werden, dass nur für die HDAH-Variante H35S ein zweiphasiges, thermisches *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten identifiziert werden konnte, während alle anderen untersuchten 4-PAM/HDAH S20C-Variant-Konjugate nur ein einphasiges ( $k$ ) *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten zeigten (Tab. 18). Verglichen mit der zweiphasigen, langsamen Ratenkonstante ( $k_{\text{slow}}$ ) des 4-PAM/HDAH-S20C Konjugats (Tab. 18) konnte festgestellt werden, dass der  $k_{\text{slow}}$ -Wert durch S-Substitution von H35 (4-PAM/HDAH-H35S) um den Faktor 2.2 beschleunigt und *vice versa* die Halbwertszeit von ca. 29 h auf ca. 13 h verringert wurde. In diesem Zusammenhang konnte

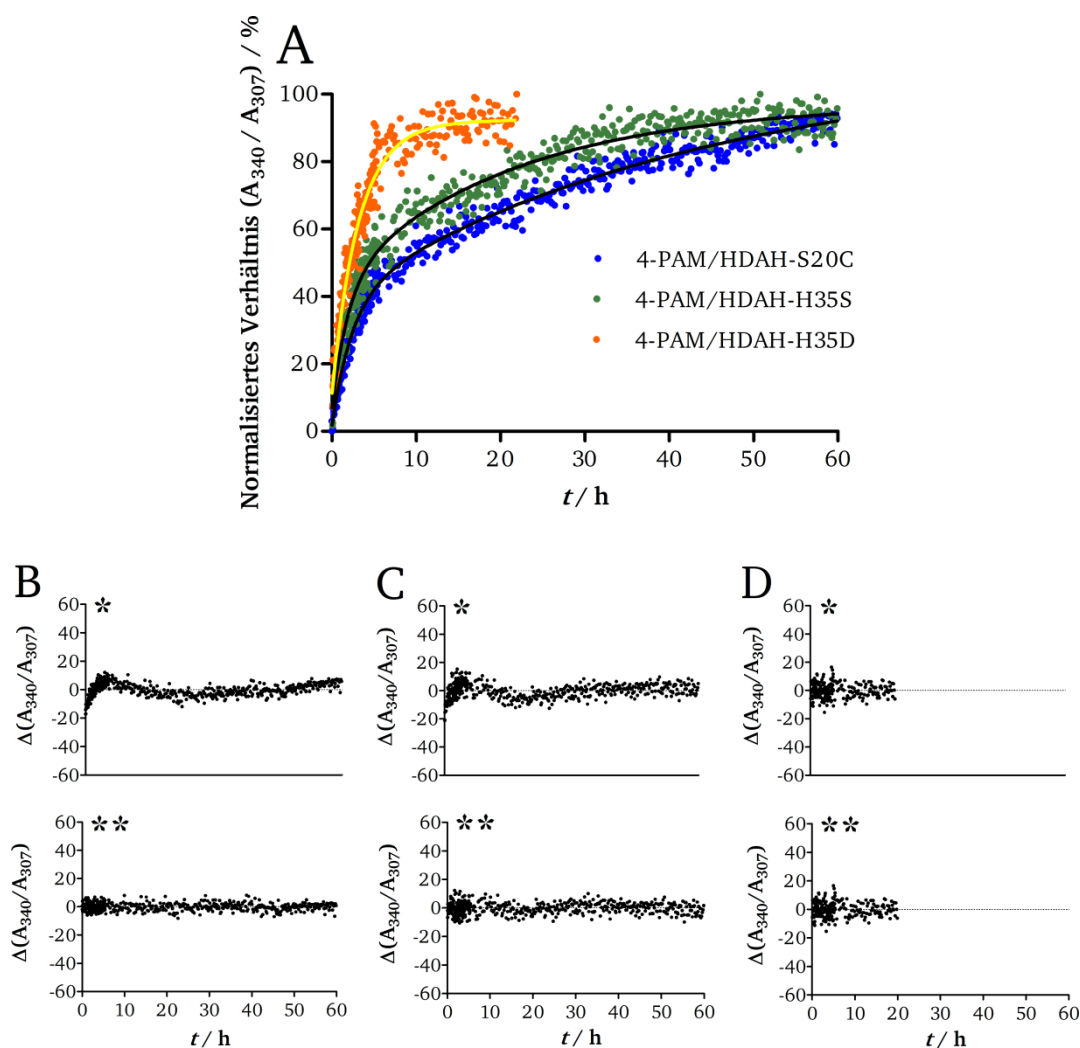


gleichzeitig auch eine Zunahme der schnellen Amplitude des 4-PAM/HDAH-H35S Konjugats um 10 % festgestellt werden. Die schnelle Ratenkonstante der zweiphasigen Kinetik ( $k_{\text{fast}}$ ) des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats blieb, verglichen mit 4-PAM/HDAH-S20C, nahezu unverändert (Tab. 18). Die D-Substitution von H35 führte hingegen, im Vergleich zur S-Substitution, zu einem vollständigen Verlust der Zweiphasenkinetik und gleichzeitig zu einer Abnahme der schnellen Ratenkonstante  $k$  (1.6-fach, Tab. 18).

Zur Veranschaulichung des wichtigsten Aminosäuresubstitutionsabhängigen Einflusses auf das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten des 4-PAM-Rests, im Hinblick auf das normalerweise bei HDAH-S20C existente H35, welches durch MD-Simulation mit der höchsten Interaktionswahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde, wurden die Kinetiken von den 4-PAM/HDAH Konjugaten S20C, H35S und H35D gegenübergestellt (Abb. 32 A). Das korrekte Analysemodell (\* = Ein- oder \*\* = Zwei-Exponential Modell) wurde anhand der jeweiligen Residuen (Abb. 32 B-D) identifiziert.

Bezugnehmend auf das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats konnte gezeigt werden, dass durch S- (H35S) und D-Substitution (H35D) von H35, die 4-PAM-Relaxation beschleunigt wurde (Abb. 32 A). Während die Relaxationskinetiken von dem 4-PAM/HDAH S20C und H35S Konjugat nur mit einem Zwei-Exponential-Modell korrekt ausgewertet werden konnten (vgl. Abb. 32 B \*/\*\* und Abb. 32 C \*/\*\*) und diese ähnliche Relaxationsverhalten aufwiesen, war die Analyse der Relaxationskinetik des 4-PAM/HDAH-H35D-Konjugats bereits mit einem Ein-Exponential-Modell möglich (Abb. 32 D \*/\*\*).

Genrell führten die S-Substitutionen, mit Ausnahme des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats, zu schnelleren thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationsraten ( $k$ ) als T- oder A-Substitutionen. Bei Vergleich der Halbwertszeiten zwischen den einphasigen Kinetiken wiesen die 4-PAM/HDAH Konjugate L37S ( $1.2 \pm 0.2$  h) und die Doppelmutante L21S/L275S ( $1.4 \pm 0.1$  h) die kürzesten sowie L275A ( $3.4 \pm 0.2$  h) und P274T ( $3.3 \pm 0.1$  h) die längsten Halbwertszeiten auf.



**Abb. 32: Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von 4-PAM/HDAH-S20C, H35S und H35D Konjugaten.** (A) Der an die HDAH-Varianten S20C (blau), H35S (grün) und H35D (orangene) angekoppelte 4-PAM-Rest wurde durch UV-A Bestrahlung in die *cis*-Konfiguration überführt (Kap. 3.2.8.1) und anschließend die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation mit einem DAD-UV/Vis-Spektrophotometer in MK-Puffer und bei 30 °C, bis zu 60 h aufgezeichnet. Das Verhältnis von ( $A_{340}/A_{307}$ ) wurde auf 100 % normalisiert, die Werte gegen die Messzeit aufgetragen und die Relaxationskinetiken mit einem Ein- (gelbe Linie) und Zwei-Exponential Modell (schwarze Linie) analysiert. Residuen der Ein- (\*) und Zwei- (\*\*) Exponential-Modell-Analyse von (B) 4-PAM/HDAH-S20C, (C) 4-PAM/HDAH-H35S und (D) 4-PAM/HDAH-H35D. Die Herstellung der untersuchten 4-PAM/HDAH-Konjugate sowie die Messung, Auswertung und Analyse der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken im Detail wurde wie in Kap. 3.2.15.4 beschrieben durchgeführt. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

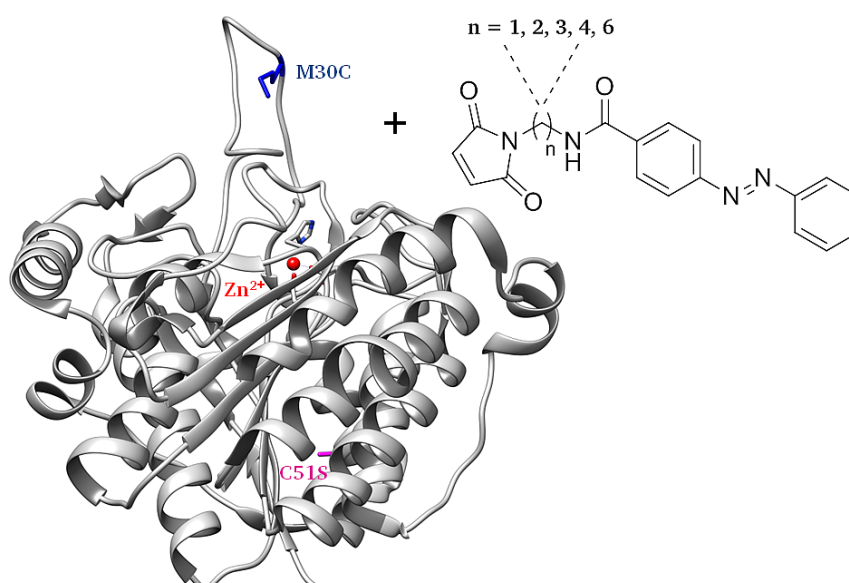
## 4.6. Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität durch Azobenzolalkyl-Maleimid-Derivate

Inhalte dieses Kapitels wurden publiziert, Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

Zur weiteren Optimierung der Photoschaltungseffizienz von dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat (50 %) wurden Azobenzolalkyl-Maleimid-Derivate (AMDs) mit unterschiedlich langen Alkylspacern synthetisiert (AMD 1a-e). Die AMDs wurden kovalent an die HDAH-Variante M30C gekoppelt und die Photoschaltung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Alkylspacerlänge und der *cis/trans*-Photoisomerisierung charakterisiert. Darüber hinaus wurde die potentielle inhibitorische Wirkung von 4-PAM und den neu synthetisierten AMDs auf die HDAH-C51S Aktivität geprüft.

### 4.6.1. AMD-Modifikation von HDAH-M30C

Die chemische Synthese und Analytik der AMDs (1a-e) erfolgte wie publiziert.<sup>17</sup> Die AMD-Modifikation der HDAH-Variante M30C erfolgte wie für 4-PAM beschrieben (Kap. 4.3.2.2) und wurde schematisch in Abb. 33 dargestellt.



**Abb. 33: Schematisch Darstellung der AMD-Modifikation von HDAH-M30C.** Die synthetisierten AMDs (1a-e) wurden kovalent an das mutierte Cystein an Aminosäureposition 30 (M30C, blau) gekoppelt und die Photoschaltungseffizienz der AMD/HDAH-Konjugate in Abhängigkeit der Alkylspacerlänge ( $n = 1, 2, 3, 4$  und  $6$ ) und der *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration untersucht. Die HDAH-Variante C51S (pink), welche kein oberflächenreaktives Cystein besitzt, wurde zur Bestimmung der inhibitorischen Potentials ( $IC_{50}$ -Werte) von 4-PAM und AMDs eingesetzt. Das Aktivzentrum ist durch das katalytische Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ , rote Kugel) illustriert, welches durch ein Histidin (H182) und zwei Aspartatreste (D180 und D268) koordinativ gebunden wird. PDB ID: 2VCG, Kette A.<sup>101</sup> Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

Die DOL-Wertbestimmung wurde wie beschrieben (Kap. 3.2.15.3) ausgeführt und die Ergebnisse in Tab. 19 zusammengefasst. Zur Überprüfung der Photoisomerisierbarkeit wurden die AMD **1a-e**/HDAH-M30C-Konjugate mit UV-A und Blaulicht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1) und UV/Vis-Spektren aufgezeichnet (Abb. A. 13).

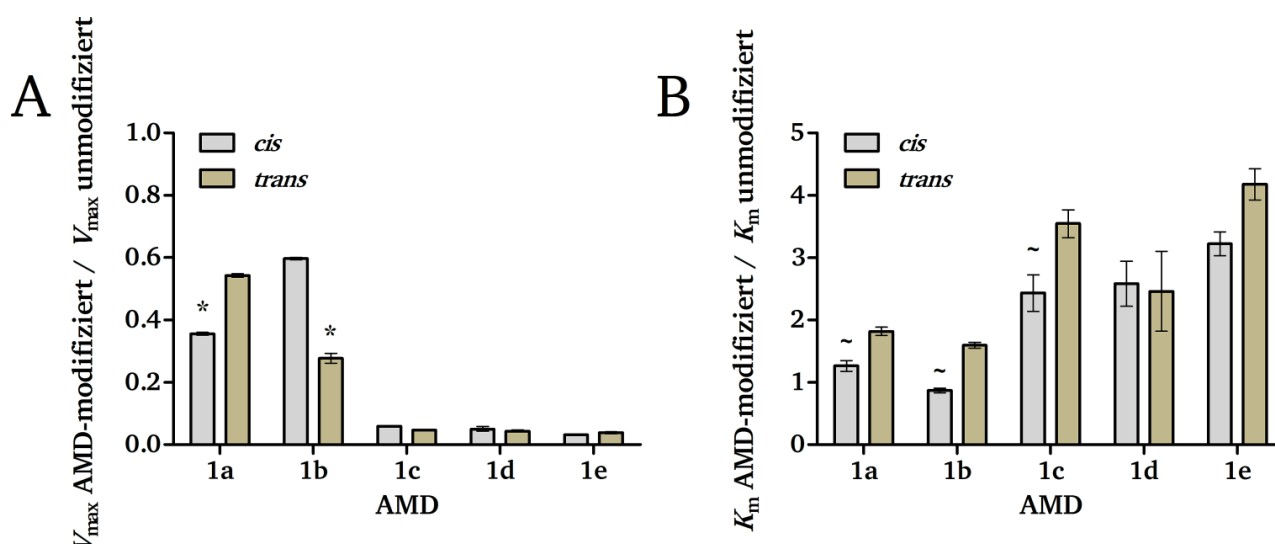
**Tab. 19: DOL-Werte der AMD-modifizierten HDAH-Variante M30C.** Das Prozedere für die DOL-Wertbestimmung von AMD **1a-e**/HDAH-Konjugaten erfolgte wie für 4-PAM beschrieben Kap. 3.2.15.3. Für die Auswertung wurde der  $\epsilon$ -Wert von *trans*-4-PAM (Tab. 11) in  $\lambda_{\max}$  von M30C (330 nm, Tab. 13) verwendet. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

AMDs	DOL-Werte
1a	1.3
1b	1.3
1c	1.3
1d	1.2
1e	0.8

Die DOL-Wertbestimmung zeigte, dass die AMDs **1a-d** an HDAH-Variante M30C in einem 1:1 molaren Verhältnis modifiziert werden konnten (Tab. 19), ähnlich wie bei 4-PAM nachgewiesen (Tab. 13). Für die AMD-**1e** Modifikation, längster Alkylspacer ( $n = 6$ ), wurde der niedrigste Wert bestimmt. Neben sterischen Gründen könnte auch die mit der Alkylspacerlänge zunehmende Hydrophobizitätssteigerung zur einer Reduktion der Reaktanden in wässriger Umgebung geführt haben oder die Maleimidgruppe partiell durch intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen zwischen mehreren AMD-**1e** Molekülen maskiert worden sein. Die Photoisomerisierung von allen konjugierten AMDs (**1a-e**) an der HDAH-M30C-Oberfläche, in die *cis*- und *trans*-Konfiguration, konnte durch UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abb. A. 13).

#### 4.6.2. Charakterisierung der AMD-Photoschaltung

Zur Untersuchung der AMD-abhängigen Photoschaltung wurden die AMD **1a-e**/HDAH-M30C-Konjugate in die *cis*- (UV-A) bzw. *trans*-Konfiguration (Blaulicht) überführt und Michaelis-Menten Kinetiken von den jeweils unmodifizierten Proben und den entsprechenden AMD/Konjugaten aufgenommen (Kap. 3.2.13.2). Zur besseren Veranschaulichung der AMD-induzierten Photoschaltung ( $V_{\max}$  und  $K_m$ -Werte) wurde jeweils der Quotient aus AMD-modifizierter HDAH-Variante in *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration und der dazugehörigen unmodifizierten HDAH-Variante gebildet (Abb. 34). Die Michaelis-Menten Parameter ( $V_{\max}$  und  $K_m$ ) wurden in Tab. A. 6 zusammengefasst.



**Abb. 34: Alkylspacer und *cis/trans*-konfigurationsabhängiger Einfluss auf die Michaelis-Menten Parameter des AMD/HDAH-M30C-Konjugats.** Die *cis/trans*-Photoisomerisierung der AMD 1a-e/HDAH-M30C-Konjugate und die Durchführung der Michaelis-Menten Kinetiken erfolgten wie in Kap. 3.2.13.2 beschrieben. Die  $V_{\max}$ - (A) und  $K_m$ -Werte (B) wurden als relative Verhältnisse der AMD-modifizierten und unmodifizierten Variante dargestellt. Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  angegeben und einer statistischen Analyse unterzogen (Einfache-ANOVA und Bonferroni post-hoc Test). <sup>a</sup> $p < 0.05$  (*cis*-AMD vs. *trans*-AMD). \* =  $V_{\max}$  photoschaltbares AMD/HDAH-Konjugat. ~ =  $K_m$  photoschaltbares AMD/HDAH-Konjugat. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

Durch die AMD-1a-Modifikation von HDAH-M30C konnte die Enzymaktivität ( $V_{\max}$ ) um 35 % geschaltet werden, wobei die *trans*-Konfiguration als aktivere Form identifiziert werden konnte und das *cis*-Isomer zu einer Verminderung der Enzymaktivität führte. Im Vergleich zu AMD-1a konnte für AMD-1b eine höhere Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität (54 %) bestimmt werden. Das *cis*-Isomer stellte hierbei, wie bislang auch bei 4-PAM nachgewiesen (Tab. 14 & Tab. 17), das aktivere Enzymkonjugat dar, während die Photoschaltung in das *trans*-Isomer die Enzymaktivität reduzierte (Abb. 34 A). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine Ankopplung von AMDs mit Alkylspacerlängen von  $n \geq 3$  (AMD-1c-e) in beiden Konfigurationen zu einer fast vollständigen Inhibierung der HDAH-M30C Aktivität führte (Restaktivität  $\leq 6$  %, Abb. 34 A). Infolge dessen konnten für die AMD 1c-e/HDAH-M30C-Konjugate keine Photoschaltung der  $V_{\max}$ -Werte ermittelt werden.

Bezugnehmend auf die Photoschaltung der  $V_{\max}$ -Werte von den AMD 1a-b/HDAH-M30C-Konjugaten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich gleichzeitig auch die  $K_m$ -Werte signifikant änderten (Abb. 34 vgl. A/B). Durch die *cis*-zu-*trans*-Isomerisierung von AMD-1a wurde der  $K_m$ -Wert um 44 % und bei AMD-1b um 84 % gesteigert (Abb. 34 B). Eine sinngemäß korrekte Photoschaltung des  $V_{\max}/K_m$ -Ensembles konnte anhand des AMD-1b/HDAH-M30C Konjugats demonstriert werden. Durch die Photoisomerisierung in die *cis*-Konfiguration wurde der  $V_{\max}$ -Wert gesteigert und gleichzeitig die Substrataffinität erhöht ( $K_m$ -Wert, abgesenkt), während die *trans*-Konfiguration zu einer Verringerung

des  $V_{\max}$ -Werts sowie der Substrataffinität ( $K_m$ -Wert, gesteigert) führte. Bei AMD-**1a** lag das  $V_{\max}/K_m$ -Ensemble gestört vor, denn für das aktivere AMD/HDAH-M30C-Konjugat (*trans*-Konfiguration) wurde simultan ein gesteigerter  $K_m$ -Wert nachgewiesen (Abb. 34 A/B). Der Grund hierfür ist womöglich, dass die Isomersetzung in das *cis*-AMD-**1a** trotz sterischer Blockierung des Aktivzentrums keine Änderung der Proteinkonformation hervorrief und demzufolge zu keiner Steigerung des  $K_m$ -Werts führte. Die Photoisomerisierung in das hydrophobere *trans*-Isomer hingegen, welches im Vergleich zu dem *cis*-AMD **1b**/HDAH M30C Konjugat die aktivere Form darstellte, induzierte gleichzeitig eine Konformationsänderung und damit eine Steigerung des  $K_m$ -Werts (Abb. 34 B).

#### 4.6.3. Inhibitorische Wirkung von 4-PAM und AMDs

Die inhibitorische Potential der *cis/trans*-Isomere von 4-PAM und AMDs (**1a-e**) wurde anhand der HDAH-C51S Aktivität ermittelt. Die genannte HDAH-Variante verfügt über kein oberflächenreaktives Cystein, welches für eine kovalente 4-PAM/AMD Modifikation erforderlich wäre, sodass der Einfluss der Azobenzol-Maleimid-Derivate direkt auf die Enzymaktivität getestet werden konnte. Die  $IC_{50}$ -Werte für die *cis/trans*-Isomere von 4-PAM und AMDs (**1a-e**) sowie für DMSO (Negativkontrolle) und SAHA (Positivkontrolle) wurden wie in Kap. 3.2.13.4 beschrieben ermittelt und in Tab. 20 zusammengefasst. Die gemessenen Dosis-Wirkungskurven, ergänzt um die von DMSO, wurden in Abb. A. 11 und die von SAHA in Abb. A. 12 dargestellt.

**Tab. 20:  $IC_{50}$ -Werte der *cis/trans*-Isomere von 4-PAM und AMDs.** Die Dosis-Wirkungskurven (Kap. 3.2.13.4) von DMSO, SAHA und den *cis/trans* Isomeren von 4-PAM und AMDs **1a-e** wurden mittels einem DreiParameter-Modell analysiert (GraphPad Prism) und die berechneten  $IC_{50}$ -Werte aufgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3. \* = Einfachbestimmung. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

Testsubstanz	$IC_{50}$ -Werte / $\mu$ M		
		<i>cis</i> -Konfiguration	<i>trans</i> -Konfiguration
DMSO	$13.7 \pm 0.6$	-	-
SAHA*	0.038	-	-
4-PAM	-	$6.1 \pm 0.8$	$5.5 \pm 0.5$
AMD <b>1a</b>	-	$6.6 \pm 0.6$	$9.6 \pm 1.2$
AMD <b>1b</b>	-	$5.6 \pm 0.6$	$7.8 \pm 0.8$
AMD <b>1c</b>	-	$6.3 \pm 0.4$	$7.6 \pm 0.8$
AMD <b>1d</b>	-	$6.9 \pm 0.7$	$5.4 \pm 0.8$
AMD <b>1e</b>	-	$6.0 \pm 0.6$	$8.7 \pm 1.0$

Bezugnehmend auf die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von 4-PAM und AMDs **1a-e** konnten sowohl zwischen den jeweiligen *cis/trans*-Konfigurationen als auch übergreifend keine maßgeblichen Unterschiede nachgewiesen werden (Tab. 20). Anhand der Negativkontrolle in Form von DMSO sowie einem bekannten HDAH-Inhibitor (SAHA) konnte demonstriert werden, dass die Isomere von 4-PAM und AMD **1a-e** einen nur sehr schwachen inhibitorischen Einfluss ( $< 10 \mu M$ ) auf die HDAH-C51S Aktivität ausübten (Tab. 20). Zusammengefasst zeigten die Azobenzol-Maleimid-Derivate, verglichen mit SAHA, eine um  $\sim 260$ -fach geringere Inhibierung der HDAH-Aktivität und wurden als nicht-inhibitorisch eingestuft. Es ist außerdem anzunehmen, dass die durch 4-PAM und AMD **1a-e** leicht verursachte Inhibierung der HDAH-C51S Aktivität wohl eher durch den in der seriellen Verdünnung enthaltenen DMSO-Anteil hervorgerufen wurde, welcher automatisch bei der Vorbereitung der Ausgangslösung eingetragen wurde (Abb. A. 11).

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die reversible Photoschaltung der HDAH-Aktivität durch *cis/trans*-Isomerisierung von monofunktionalen Azobenzol-Maleimid-Derivaten (4-PAM & AMDs **1a-e**) und speziell der für 4-PAM vorherrschende Photoschaltungsmechanismus an der Proteinoberfläche untersucht. Die lichtschtbaren Elemente wurden hierzu selektiv an definierte Cysteinreste nahe der Aktivkanaleintrittsfläche angekoppelt.

In den nachfolgenden Abschnitten wird auf die Entwicklung der photoschaltbaren HDAH sowie die durch 4-PAM und den AMDs (**1a-e**) vermittelte Photoschaltung der HDAH-Aktivität eingegangen und insbesondere die Stabilisierung der metastabilen *cis*-4-PAM-Konfiguration an der HDAH-S20C Oberfläche und der dabei vorherrschende Photoschaltungsmechanismus diskutiert.

---

### 5.1. Identifizierung und Eliminierung oberflächenzugänglicher HDAH-Cysteine

---

Damit HDAH an definierten Stellen selektiv durch 4-PAM modifiziert werden konnte, wurden die sechs existenten HDAH-Cysteine auf 4-PAM-Modifizierbarkeit geprüft. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die Proteinstruktur von HDAH durch ortsspezifische Mutagenese so gering wie möglich zu beeinträchtigen. Durch die initiale SASA-Kalkulation konnte das für die 4-PAM-Modifikation zur Verfügung stehende HDAH-Wt-Cystein (C51), welches zudem den höchsten SASA-Wert aufwies, relativ gut vorhergesagt werden (Abb. 18 B). Aufgrund von fast ähnlich bestimmten SASA-Werten von C51 und C207 konnte zu Beginn eine 4-PAM-Modifikation an beiden Cysteinen nicht ausgeschlossen werden. **Dass definitiv nur C51 durch 4-PAM modifiziert wurde, konnte durch die DOL-Wertbestimmung, LC-ESI-MS Analyse sowie anschließende S-Substitution von C51 und finaler PEG-M-Modifikation nachgewiesen werden.** Für eine akkurate und reproduzierbare Anwendung der DOL-Wertbestimmungsmethode wurde der molare Extinktionskoeffizient von *trans*-4-PAM bestimmt, dem thermodynamisch stabileren Isomer, und die 4-PAM-Modifikationsbedingungen im Detail an HDAH-Wt in MK-Puffer getestet (Abb. 18 B). Obwohl die 4-PAM-Modifikation von HDAH-Wt bereits mit einem 2-fach molaren Überschuss an 4-PAM gegenüber der eingesetzten Proteinkonzentration und einer Reaktionsdauer von 1 h vollständig abgeschlossen werden konnte, wurde um ein absolut sicheres Modifikationsprozedere zu gewährleisten, ein 4-fach molarer 4-PAM-Überschuss und eine Reaktionsdauer von 2 h gewählt. Dass bei der LC-ESI-MS Analyse auch das nicht 4-PAM-modifizierte Peptidfragment nachgewiesen werden konnte, ist auf den abgeschätzten Fehler ( $\pm 13\%$ ) für die DOL-Wertbestimmung zurückzuführen. Dieser Zusammenhang wäre trotz eines bestimmten DOL-Wertes von 1 für das 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat (Tab. 13) begründet.

---



## 5.2. Generierung von Cystein-HDAH-Varianten

Die durch ortsspezifische Mutagenese generierten HDAH-Cystein-Varianten zeigten im Vergleich zu HDAH-Wt keine auffälligen Änderungen in der Enzymaktivität, mit Ausnahme von HDAH-D98C und S20C. Da bei beiden genannten HDAH-Varianten nur der  $V_{\max}$ -Wert beeinflusst wurde und der  $K_m$ -Wert unverändert blieb, nahm die Cysteinsubstitution vermutlich einen direkten Einfluss auf die Substratkatalyse. Bei HDAC8 ist bekannt, dass der in der L2-Schleife hochkonservierte D101-Rest essentiell für die Substratbindung/Erkennung verantwortlich ist und eine Veränderung zu einem drastischen Aktivitätsverlust führt.<sup>140</sup> Im Vergleich zu HDAC8 ist der bei HDAH vorhandene D98-Rest ähnlich nahe an dem Aktivkanaleingang lokalisiert (Abb. 22) und dieser möglicherweise in der Substraterkennung involviert (Tab. 14). Die mit der S20C-Mutation verbundene  $V_{\max}$ -Wert Steigerung ist vermutlich das Resultat einer optimierten Substratbindung, hervorgerufen durch eine verbesserte räumliche Ausrichtung der flexiblen Schleifenregion (Aminosäuren 16-38).<sup>99</sup>

## 5.3. Photoschaltung der HDAH-Aktivität durch 4-PAM

Durch die etablierte DOL-Wertbestimmung konnte die kovalente 4-PAM-Modifikation von HDAH-Wt und den auf Basis von HDAH-C51S generierten HDAH-Cystein-Varianten (S20C, M30C, D98C, M150C, D211 und E340) quantifiziert werden. **Maximal wurde ein DOL-Wert von 1 nachgewiesen, welcher einem 1:1 molaren Modifikationsverhältnis von 4-PAM pro HDAH-Molekül entsprach.** Die selektive 4-PAM-Modifikation an den jeweils einzelnen, durch ortsspezifische Mutagenese generierten Cysteinpositionen, diente als Grundlage für die fundierte Untersuchung einer reversiblen Photoschaltung der HDAH-Aktivität, ausdrücklich durch *cis/trans*-Isomerisierung des kovalent angekoppelten 4-PAM-Rests.

Die experimentell bestimmten Photoschaltungseffizienzen der drei signifikant und reversibel photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Konjugate (M30C > S20C > M150C) entsprachen der tatsächlich gemessenen Aktivitätsschaltung, aufgrund nachgewiesener DOL-Werte von 1 (Tab. 13). **Eine Inaktivierung/Aktivierung der photoschaltbaren HDAH-Konjugat-Aktivität durch *cis/trans* Photoisomerisierung des angekoppelten Azobenzolrests konnte nicht vollständig erreicht werden. Der Maximalwert betrug 50 % (HDAH-M30C).** Am Beispiel der drei genannten photoschaltbaren 4-PAM/HDAH-Konjugate und deren unterschiedlich bestimmten Photoschaltungseffizienzen konnte zudem demonstriert werden, welchen essentiellen Einfluss die Cysteinpositionierung auf die räumliche Ausrichtung des angekoppelten 4-PAM-Rest und damit auf die sterische Blockierung des Aktivkanals nahm. Im Vergleich zu der M30C-Variante führte die *cis*-4-PAM

Ankopplung bei der S20C und M150C-Variante zu einem reduzierten  $V_{\max}$ - und gesteigerten  $K_m$ -Wert (Tab. 14). Begründet wurde dies durch die räumliche Nähe der modifizierbaren Cysteinreste zum Aktivkanal (Abb. 22), der damit partiell verbundenen sterischen Blockierung der Aktivkanaleintrittsfläche und einer durch Konformationsänderung hervorgerufenen verschlechterten Substraterkennung. Interessanterweise induzierte eine Photoisomerisierung in die *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration, bei den beiden zuletzt genannten HDAH-Varianten, keine Änderung der  $K_m$ -Werte, sondern nur eine Veränderung von  $V_{\max}$ . Dies wurde auch bei dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat nachgewiesen. **Die Tatsache, dass die Aktivität von artifiziell hergestellten photoschaltbaren Enzymen hauptsächlich durch die Änderung von  $V_{\max}$  gesteuert wird, konnte ebenfalls bei Verwendung eines bifunktionalen<sup>88</sup> oder monofunktionalen Azobenzol-Maleimid-Derivats<sup>83</sup> festgestellt werden.** In den genannten Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die aktivere Form durch das *cis*-Isomer und die inaktivere Form durch das *trans*-Isomer vermittelt wurde. Dieser Sachverhalt ist allerdings nicht zwingend notwendig, um Proteinfunktionen photokontrollieren zu können. Am Beispiel von EG 12A konnte die Enzymaktivität mit Hilfe von zwei photo- (Azobenzol enthaltend) und temperaturresponsiven Copolymeren sowohl durch das *cis*- als auch das *trans*-Isomer aktiver/inaktiver geschaltet werden.<sup>23</sup>

**Eine vollständige Inaktivierung/Aktivierung von anderen Enzymen konnte durch chemische Modifikation mit monofunktionalen Azobenzolderivaten ebenfalls nicht realisiert werden.**<sup>23,83,141</sup>

In diesem Zusammenhang wurden im Vergleich zu dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat ähnliche Photoschaltungseffizienzen erzielt. So konnte für die Aktivitätskontrolle einer Maus Kinesin ATPase<sup>83</sup> (s. Kap. 1.3.2) sowie einer Rinder Carboanhydrase II<sup>141</sup>, eine Photoschaltungseffizienz von  $\sim 50\%$  nachgewiesen werden. Für die Photokontrolle der Rinder Carboanhydrase II wurde das „*photoswitchable affinity label*“ (PAL)-Konzept verwendet. Hierbei wurde das photoschaltbare Element durch einen Liganden im Aktivzentrum justiert und dieses über eine reaktive Epoxidgruppe an eine räumlich nahe gelegene Aminosäure kovalent angekoppelt. In Bezug auf die bereits erwähnte Photokontrolle der EG 12A<sup>23</sup> Aktivität durch ein photo- und temperaturresponsives Copolymer (Abb. 8) wurde eine höhere Photoschaltungseffizienz nachgewiesen. Hierbei konnten  $\sim 75\%$  erzielt werden, wenn das jeweils aktivere Isomer als 100 % angesehen wird. Die höhere Photoschaltungseffizienz ist vermutlich auf die Kollabierung des Copolymers zu einer knäulartigen-Struktur und der damit verbesserten, sterischen Blockierung der funktionalen Region zurückzuführen.

Die multiple und reversible Photokontrolle der 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat-Aktivität konnte beständig durch alternierende *cis/trans*-Isomerisierung des angekoppelten 4-PAM-Rests gezeigt werden (Abb. 26). Eine Photoschaltungseffizienz wie sie bei den Michaelis-Menten Kinetiken bestimmt werden

konnte (50 %), wurde nicht erreicht. Es wird vermutet, dass der Grund für die knapp um die Hälfte reduzierte Photoschaltungseffizienz auf die zu kurze UV-A Bestrahlungszeit zurückzuführen ist. Da die reversible Aktivitätsschaltung unter Substratsättigung (10-facher  $K_m$ -Wert) durchgeführt wurde, wurde ein substratkonzentrationsabhängiger Einfluss bzgl.  $V_{max}$  ausgeschlossen. Um die Aktivitätsschaltung zu maximieren und diese womöglich einer 50 %igen Photoschaltung anzunähern, hätte unter Berücksichtigung der durch die Handlampe eingetragenen Energiedosis (25 min =  $1.6 \text{ J cm}^{-2}$ ) und zur Einspeisung ähnlicher Energien durch die Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe die UV-A Bestrahlungszeit (1 min =  $0.5 \text{ J cm}^{-2}$ ) auf 4 min erhöht werden müssen. Trotz eines nahezu vergleichbaren ermittelten *trans/cis* Verhältnis für das 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat, welches als Indiz für das Vorhandensein von ähnlichen PSS nach UV-A und Blaulichtbestrahlung mit den Handlampen bzw. der Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe betrachtet wurde, schien die UV-A Bestrahlung (1 min) mit der Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe einen geringeren *cis*-Anteil von ca. 24 % zu generieren.

---

#### 5.4. 4-PAM Photoschaltungsmechanismen

---

Durch die MD-Simulation konnten zwei potentielle Modi zur Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-Konjugat-Aktivitäten abgeleitet werden:

Bei **Modus 1 (4-PAM/HDAH-M30C, Abb. 29 A1)** wird die Enzymaktivität direkt durch Distanzänderung des angekoppelten 4-PAM-Rests geschaltet, indem die längenexpandierte *trans*-Konfiguration direkt in Richtung des katalytischen Zink-Ions ausgerichtet wurde und demzufolge zu einer sterischen Blockierung des Aktivkanals führte. Durch die Isomerisierung in die gestauchte *cis*-Konfiguration hingegen kann die *trans*-vermittelte Blockierung aufgehoben werden. Diese Beobachtung deckte sich mit den erhobenen Michaelis-Menten Parametern, denn bei dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat führte die *cis/trans* 4-PAM-Photoisomerisierung ausschließlich zu einer Änderung der  $V_{max}$ -Werte. Die Substrataffinität bzw. die Substraterkennung ( $K_m$ -Wert) blieb dabei unbeeinflusst. Fundiert wurde dieser Sachverhalt durch die in Abb. 29 A1 dargestellte MD-Simulation des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats, denn die für die Substraterkennung erforderliche räumliche Ausrichtung der flexiblen Schleifenregion (Aminosäuren 16-38)<sup>99</sup> wurde durch die 4-PAM Modifikation bzw. *cis/trans* Photoisomerisierung nicht signifikant beeinträchtigt. **Anhand des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats konnte gezeigt werden, dass eine sterische und reversible Blockierung der Aktivkanaleintrittsfläche bzw. des Aktivzentrums durch *cis/trans*-4-PAM-Photoisomerisierung möglich war, ohne Einflussnahme auf die Proteinkonformation (gleichbleibender  $K_m$ -Wert, Tab. 14).**

---

Bei Modus 2 (4-PAM/HDAH-S20C, Abb. 29 B1) hingegen wird die Konjugat-Aktivität vermutlich nicht direkt durch die *cis/trans*-Isomerisierung hervorgerufene Distanzänderung des angekoppelten 4-PAM-Rests gesteuert, sondern vielmehr durch eine erhebliche Konformationsänderung der flexiblen Schleifenregion (Aminosäuren 16-38)<sup>99</sup>. Wie bereits in Kap. 5.2 angesprochen, scheint die flexible Schleifenregion von HDAH eine wichtige Rolle in der Substraterkennung/Bindung zu spielen, welches experimentell anhand der HDAH-Variante S20C durch die 4-PAM-Modifikation (*cis/trans*-Isomer) verursachte Substrataffinitätsabnahme bestätigt werden konnte (Tab. 14). Die konformationsvermittelte, sterische Blockierung des Aktivzentrums in Abhängigkeit der *cis/trans* Isomerisierung wurde durch Veränderung der Aktivkanaleintrittsfläche abgeleitet. Hierbei wurde für die Isomerisierung von *cis* (335 Å<sup>2</sup>) nach *trans* (206 Å<sup>2</sup>) eine Reduzierung der Aktivkanaleintrittsfläche des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats um 39 % vorhergesagt. In Bezug auf den zuletzt genannten, vorhergesagten Wert, welcher sich gut mit der für das 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat bestimmten Photoschaltungeffizienz (40 %) in Übereinstimmung bringen ließ, basiert die Aktivitätsänderung ( $V_{\max}$ ) und die damit verbundene sterische Blockierung des Aktivkanals vermutlich auf einer lichtgesteuerten Konformationsschaltung der flexiblen HDAH-Schleifenregion (Aminosäuren 16-38).

---

## 5.5. Photoschaltungsmechanismus des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats

---



---

### 5.5.1. Abhängigkeit von definierten Aminosäuresubstitutionen

---

Durch die Photoisomerisierung von 4-PAM kommt es nicht nur zu einer Längenexpansion (*trans*-Konfiguration) oder Stauchung (*cis*-Konfiguration) des Moleküls, sondern auch zu einer Änderung des Dipolmoments, wie für Azobenzol beschrieben.<sup>142</sup> Gerade diese zusätzliche Eigenschaft als Polaritätsschalter zu wirken, ermöglicht die Ausbildung nicht-kovalenter Interaktion mit unterschiedlichen Aminosäuren und demzufolge eine Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche. Insbesondere durch das systematische Mutagenese-Experiment an HDAH-S20C konnten wichtige Erkenntnisse über die Stabilisierung der *cis*-4-PAM-Konfiguration an Proteinoberflächen sowie Informationen über den Photoschaltungsmechanismus gewonnen werden. Durch die Identifizierung der dabei potentiell involvierten Aminosäuren und die darüber vermittelten intermolekularen Interaktionen konnte das Zustandekommen von bimolekularen/zweiphasigen, thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken von 4-PAM/HDAH-Konjugaten erklärt und ein Interaktions-/Photoschaltungsmodell abgeleitet werden.

Für die Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat Aktivität wird aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Hydrophobizitätsänderungen und der vorhergesagten räumlichen Nähe der untersuchten Aminosäuren zueinander (Abb. 31 B) angenommen, dass die Leistungsfähigkeit des Photoschaltungsmechanismus durch einen konservierten, hochsensitiven hydrophoben Cluster (HC) vermittelt wird. Der HC setzt sich aus den vier hydrophoben Aminosäuren L21, L37, P274 und L275 zusammen und ist obligatorisch für die Gewährleistung der maximalen Photoschaltungseffizienz von 40 %. Eine Störung des HC durch Änderung der Hydrophobizität (z.B. polarere Umgebung durch S-Substitution) oder durch Reduzierung raumfüllender hydrophober Reste (z.B. A-Substitution) führen zu einer **Fehlausbildung des HC und demnach zu einem partiellen oder ganzheitlichen Verlust der Photoschaltbarkeit** (Tab. 17). Die Funktion des HC und damit die Befähigung zur Photoschaltung ist höchstwahrscheinlich die Koordination der flexiblen Schleifenregion (Aminosäure 16-38), welche L21 und L37 beinhaltet, mit der gegenüberliegenden rigideren Schleifenstruktur, in der P274 und L275 lokalisiert sind. Diese Annahme wird durch die ermittelten B-Faktoren unterstützt (L21 = 40.1; L37 = 30.1; L275 12.8 und P274 = 8.9), wobei L21 den flexibelsten Rest darstellt. Die hohe Empfindlichkeit des HC gegenüber Hydrophobizitätsänderungen konnte zudem in besonderem Maße anhand der HDAH-L21S-Variante demonstriert werden. Obwohl ein ähnlicher  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Wert (leicht erhöht) verglichen mit dem Referenzkonjugat (4-PAM/HDAH-S20C) ermittelt wurde und demnach keine kritischen Konformationsänderungen zu erwarten waren, führte die S-Substitution dennoch zu einem vollständigen Verlust der Photoschaltbarkeit (Tab. 17). Dieser Sachverhalt und der Hinweis, dass bei einer Verkürzung des aliphatischen L21-Rests durch A dennoch eine Photoschaltungseffizienz gemessen werden konnte, deutet auf die hypothetisch vorgeschlagene, hydrophob-basierte Brückenstruktur zwischen L21 und L275 hin (Abb. 31 B), die an der Koordination der beiden genannten Schleifenstrukturen beteiligt ist. Aufgrund der hohen Flexibilität von L21, scheint der substituierte Alaninrest (L21A) weiterhin an einer Koordination der rigiden Schleifenstruktur beteiligt zu sein und diesbezüglich nur eine partielle Photoschaltung (19 %) zu vermitteln. Ähnliches gilt auch für die L37A-Variante, wobei die Photoschaltungseffizienz im Vergleich zum 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat nur gering beeinflusst wurde. Durch die A-Substitution hervorgerufene starke Reduzierung des  $V_{\max}$ -Werts (L37A) wird angenommen, dass die aliphatische Verkürzung zu einer engeren Zusammenlagerung der flexiblen und rigiden Schleifenregion führte, infolge dessen das Aktivzentrum sterisch negativ beeinflusst wurde aber dennoch durch Ausbildung des HC die Photoschaltung erhalten blieb.

Aufgrund der experimentellen und durch MD-Simulation gewonnenen Erkenntnis, dass **L275 bei der *cis*- und *trans*-4-PAM basierten Photoschaltung der HDAH-S20C Aktivität involviert** ist (Abb. 31

B/C), scheint diese Aminosäure für beide 4-PAM-Isomere die **Funktion eines räumlichen Fixierungspunkts bezüglich der Maleimidgruppe** einzunehmen. Dies würde bei beiden Isomeren die Rotation des angekoppelten 4-PAM-Rests um die Thioetherbindung verhindern, wobei dies bei der *trans*-Konfiguration durch die bereitgestellte Wasserstoffbrückenbindung von Q31 (Donor -NH, Peptidbindung) zusätzlich unterstützt werden würde. Allgemein scheint die durch die beiden 4-PAM Isomere vermittelte Photoschaltung der HDAH-S20C Aktivität einem Ensemble zu entsprechen, bei dem durch simultane Polaritäts- und Längenänderungen sowie der damit induzierten räumlichen Umorientierung beide Isomere unterschiedlich an der Proteinoberfläche arretiert werden. Die Arretierung basiert dabei auf intermolekularen Interaktionen zwischen dem jeweiligen 4-PAM Isomer und den dafür beschriebenen Aminosäuren.

---

## 5.6. Stabilisierung der *cis*-4-PAM-Konfiguration an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche

---

Zur Identifizierung intermolekularer Interaktionen, die für die Stabilisierung des *cis*-4-PAM-Zustands verantwortlich sein könnten, wurden MD-Simulation prognostizierte Aminosäuren einer systematischen Mutagenese unterzogen und der Einfluss der Aminosäuresubstitution auf das thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationsverhalten von 4-PAM untersucht (Tab. 18).

Dass bei dem 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugat eine zweiphasige Kinetik nachgewiesen werden konnte, gibt den Hinweis auf Beteiligung einer nicht-kovalenten, polaren (Dipol-Dipol) Interaktion zwischen dem polaren *cis*-Isomer des angekoppelten 4-PAM-Rests und dem substituierten Serin. Zusätzlich könnte auch der temporär ausgebildete *cis-trans* Übergangszustand durch Dipol-Dipol Interaktionen stabilisiert werden, welcher in polaren Lösungsmitteln einen Dipolcharakter aufweist.<sup>143</sup> Für die H35S-Mutation wurde angenommen, dass das zweiphasige Relaxationsverhalten tatsächlich auf die S-Mutation selbst zurückzuführen und nicht Resultat einer willkürlichen Proteinkonformationsänderung war. Dafür sprechen die Aufrechterhaltung der nahezu maximal erreichten Photoschaltungseffizienz von 40 %, die geringfügige Reduzierung von  $V_{\max}$  und der im Vergleich zu dem 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat ähnlich schnell ermittelten Ratenkonstante ( $k_{\text{fast}}$ ) bzw. zweiphasigen Relaxationsverhalten (Abb. 32). Für die verminderte Photoschaltungseffizienz des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats wird allenfalls vermutet, dass die HC-Zusammenlagerung durch die Mutation leicht gestört wurde und dies zu der 6 %igen Reduzierung der maximalen Photoschaltungseffizienz führte (34 %). Die messbare zweiphasige Kinetik des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats bestätigte außerdem die MD-Simulationsvorhersage, dass H35 tatsächlich die höchste Interaktionswahrscheinlichkeit mit dem angekoppelten 4-PAM-Rest besaß und dadurch eine rationale Untersuchung intermolekularer Interaktionen zwischen H35 und *cis*-4-PAM



möglich war. **Um nochmals zu betonen, dass H35 kein Bestandteil des HC darstellt und demnach hauptsächlich an der *cis*-4-PAM-Stabilisierung beteiligt ist, wurde eindeutig anhand der S-Substitution nachgewiesen.** Die S-Substitution führte bei L21, L37, P274 und L275 zu einem vollständigen Verlust der Photoschaltungseffizienz (Tab. 17).

**Für die langsame Komponente der zweiphasigen Relaxationskinetik ( $k_{\text{slow}}$ ) des 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugats wurde angenommen, dass diese die polaren Interaktionen (Dipol-Dipol) mit dem polaren *cis*-Isomer widerspiegelt.** Die im Vergleich zu dem 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat ( $t_{1/2} = 29$  h) nachgewiesene reduzierte Halbwertszeit auf 13 h ist vermutlich auf das bei HDAH-S20C existente H35 zurückzuführen, welches zusätzlich in der Lage wäre Dipol-Dipol als auch Ion-Dipol Interaktionen auszubilden. Es ist bekannt, dass in Proteine eingebettete Histidine einen durchschnittlichen pKa von 6.6<sup>144</sup> aufweisen und demnach in wässrigen Systemen partiell protoniert sein können. Da alle Experimente in MK-Puffer (pH 7.2) durchgeführt wurden, wurde für Histidine eine Partial-Protonierung von  $\leq 50$  % angenommen. Prinzipiell ist in diesem Zusammenhang eine durch H35 vermittelte Ion-Dipol Interaktion mit dem polaren *cis*-4-PAM-Isomer oder dem potentiell in polaren Lösungsmitteln auftretenden, temporär negativ geladenen *cis-trans* Übergangszustand<sup>62</sup> denkbar. **Neben Dipol-Dipol und Ion-Dipol Interaktionen konnten durch MD-Simulationsanalyse auch aromatische  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen zwischen der endständigen Phenylgruppe des an HDAH-S20C angekoppelten *cis*-4-PAM-Rests und H35 vorhergesagt werden (Abb. 31 B, Tab. A. 4, 3.8 Å).** Zwischen den beiden aromatischen Ebenen wurde eine *edge-to-face* orientierte  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion mit einem Winkel von  $80 \pm 10^\circ$  prognostiziert.

Histidin stellt durch seine vielseitigen physikochemischen Eigenschaften und der damit verbundenen Flexibilität, auf unterschiedliche Zustände von 4-PAM (polar, partiell negativ geladen und unpolar) reagieren zu können, die interessanteste Aminosäure zur simultanen Vermittlung verschiedener intermolekularen Interaktionen (Dipol-Dipol, Ion-Dipol und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen) dar. In diesem Zusammenhang konnte damit auch erklärt werden, weshalb für das 4-PAM/HDAH-H35S-Konjugat, im Vergleich zu HDAH-S20C, eine wesentlich kürzere Halbwertszeit für die langsame Komponente ( $k_{\text{slow}}$ ) nachgewiesen wurde. **Im Vergleich zu Serin wurde durch H35 das *cis*-Isomer bzw. der *cis-trans*-Übergangszustand des angekoppelten 4-PAM-Rests stärker stabilisiert und infolge dessen die Halbwertszeit ( $k_{\text{slow}}$ ) um 16 h verlängert.**

Basierend auf den Ergebnissen zu den thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken und den Michaelis-Menten Parametern wurde für das Zustandekommen der zweiphasigen Relaxationskinetiken ( $k_{\text{fast}}$  und  $k_{\text{slow}}$ ) der 4-PAM/HDAH S20C und H35S Konjugate angenommen, dass die Stabilisierung des

*cis*-4-PAM-Isomere durch zwei unterschiedliche Typen von intermolekularen Interaktionen vermittelt wird. Bei **Typ 1 (Ratenkonstanten:  $k$  und  $k_{\text{fast}}$ )** erfolgt die Stabilisierung des *cis*-Isomers durch **hydrophobe Interaktionen**, welche hauptsächlich durch den hypothetischen HC (**L21, L37, P274 und L275; Abb. 31 B**) vermittelt werden. Hierbei wird vorgeschlagen, dass der HC insbesondere mit den beiden Phenylgruppen von *cis*-4-PAM interagiert (Abb. A. 5 & Tab. A. 4) und dadurch die Ausbildung des *cis-trans* Übergangszustands bzw. die *cis-zu-trans* Relaxation schließlich selbst verlangsamt. Dem **Typ 2 (Ratenkonstante:  $k_{\text{slow}}$ )** wird vor allem die **Dipol-Dipol Interaktion** zugeordnet, welche zu einer verstärkten Stabilisierung der *cis*-4-PAM-Konfiguration bzw. des *cis-trans* Übergangszustands führt und **vermutlich** durch zusätzlich **involvierte Ion-Dipol und aromatische  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen** gesteigert wird.

Damit die Stabilisierung der *cis*-4-PAM-Konfiguration Zustandekommen und als Indikator dafür eine zweiphasige Relaxationskinetik gemessen werden konnte, war eine akkurate räumliche Koordination zwischen dem *cis*-4-PAM-Rest und H35 oder H35S erforderlich. Basierend darauf, dass für die 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugate mit Ausnahme von H35S nur eine einphasige Kinetik nachgewiesen werden konnte (Tab. 18), wurde angenommen, dass die Ursache hierfür leichte Konformationsänderungen innerhalb der HDAH-S20C-Struktur sein könnten. Diesbezüglich wären **bereits leichte strukturelle Veränderungen in der hoch flexiblen Schleifenregion (Aminosäure 16-38) ausreichend, um die Koordination zwischen *cis*-4-PAM und H35 bzw. H35S zu vermeiden**. Die allgemein durch die S-Substitution beschleunigten Ratenkonstanten ( $k$ ) der 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugate ist vermutlich auf eine Zusammenlagerungsstörung des normalerweise eng koordinierten HC durch den Polaritätseintrag von S zurückzuführen. Die damit räumlich weniger eingeschränkte Durchführung der thermischen *cis-zu-trans* Relaxation von 4-PAM könnte im Vergleich zu der jeweiligen A-Substitution die Ursache sein.

Durch **Übertragung des postulierten Zwei-Typen Interaktionsmodells**, abgeleitet von 4-PAM/HDAH-S20C und 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugaten, **auf alle in der Arbeit gemessenen thermischen *cis-zu-trans* Relaxationskinetiken** kann das einphasige und zweiphasige Relaxationsverhalten erklärt werden. Wie vorgeschlagen, wurden die Ratenkonstanten  $k$  und  $k_{\text{fast}}$  hydrophoben Interaktionen zugeordnet und die Ratenkonstante  $k_{\text{slow}}$  Dipol-Dipol, Ion-Dipol und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Sinngemäß wurde für absolut ungebundenes 4-PAM in MK-Puffer die schnellste thermische *cis-zu-trans* Relaxation mit einer Einphasigen Kinetik (Ratenkonstante  $k$ ) bestimmt. Bei dem 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat hingegen wurde eine zweiphasige Kinetik nachgewiesen, welches auf Beteiligung von Interaktionen des Typ 1 und Typ 2 hindeuten würde. Bei Betrachtung von  $k_{\text{fast}}$  im Vergleich zu ungebundenem 4-PAM wurde eine ähnlich schnelle Ratenkonstante festgestellt welches



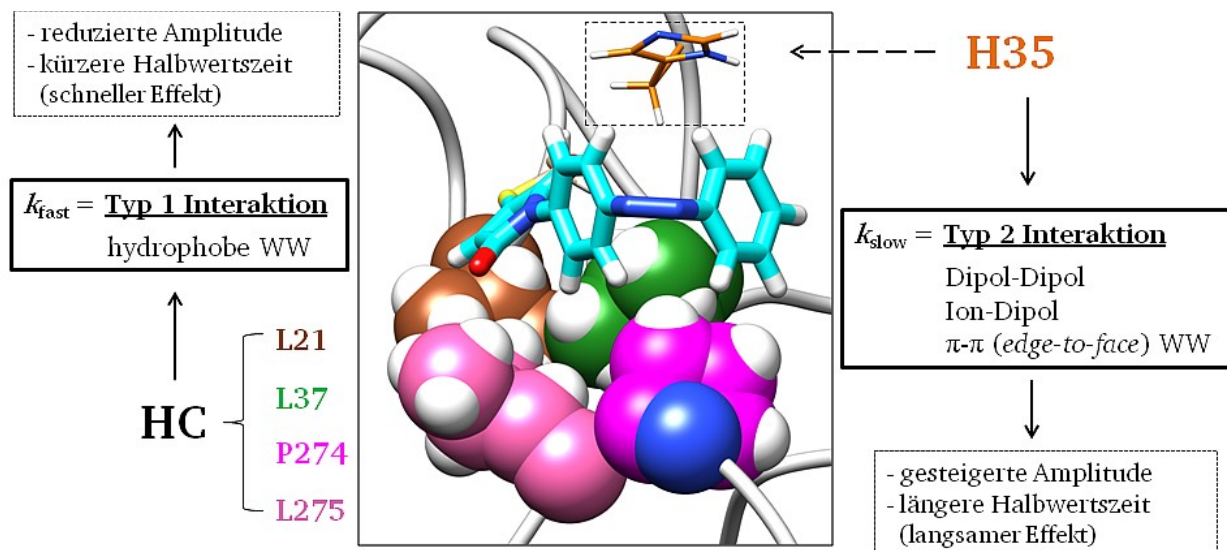
impliziert, dass die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation des angekoppelten 4-PAM-Rest ohne Beteiligung von hydrophoben Interaktionen an der HDAH-Wt-Oberfläche durchgeführt wurde und demnach eine Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen ausgeschlossen. Basierend darauf, dass für das **4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat** zusätzlich eine langsame Komponente (Ratenkonstante  $k_{\text{slow}}$ ) bei der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation nachgewiesen werden konnte, wurde die **Anteilnahme von Typ 2 Interaktionen** in Betracht gezogen, welche **durch ein Histidin vermittelt** werden können. Bestätigt werden konnte die Hypothese strukturell durch ein benachbartes Histidin, welches im Abstand von drei Aminosäuren (H47) zu C51 lokalisiert ist (Abb. A. 16). Der im Vergleich zu den 4-PAM/HDAH-M30C und S20C Konjugaten  $\sim 11$ -fach gesteigerte  $k_{\text{slow}}$ -Wert und der damit verbundenen sehr kurzen **Halbwertszeit ( $\sim 3$  h)** ist möglicherweise auf die relativ nahe räumliche Orientierung von H47 zur 4-PAM-Modifikationsstelle und einer dabei suboptimalen Koordination beider Elemente zueinander zurückzuführen. Nichtsdestotrotz unterstützt diese Erklärung weiterhin die Hypothese, dass Histidin an Typ 2 Interaktionen mit *cis*-4-PAM oder dessen *cis-trans* Übergangszustand beteiligt ist. **Gleichzeitig wird aber auch deutlich, dass für eine starke Stabilisierung bzw. zur Generierung einer hohen Halbwertszeit ( $\geq 29$  h, HDAH-S20C und M30C) eine präzise Koordination zwischen dem angekoppelten 4-PAM-Rest und dem entsprechenden Histidin von größter Bedeutung ist.** Ein weiterer Hinweis dafür, dass Histidin tatsächlich an der Halbwertszeitsteigerung bei thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationen von Azobenzol-Derivaten beteiligt sein könnte, ist die nachgewiesene stark verlangsamte *cis*-zu-*trans* Relaxation ( $t_{1/2} = \sim 63$  h) einer photoschaltbaren Aminosäure, eingebettet in der  $\alpha$ -Helix eines S-Peptid Analogons, benachbart zu einem Histidin.<sup>53</sup> Die im Vergleich zu dem 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugat reduzierten schnellen Ratenkonstanten ( $k_{\text{fast}}$ ) von 4-PAM/HDAH S20C und M30C sind höchstwahrscheinlich auf die in diesen Arealen der Cystein-Modifikationsstellen (S20C, M30C) vorhandenen HCs zurückzuführen (Typ 1 Interaktion), die mit dem angekoppelten 4-PAM-Rest stärker wechselwirken können. In der Umgebung von dem HDAH-Wt-Cystein (C51) konnte eine solche ausgeprägte Struktur nicht identifiziert werden, welches die um bis zu 2.6-fache Reduzierung der  $k_{\text{fast}}$ -Werte von HDAH-S20C und M30C erklären könnte. **Das Typ 1/2-Interaktionsmodell, abgeleitet auf den Erkenntnissen des 4-PAM/HDAH-S20C-Konjugats, konnte auf das 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat partiell angewandt werden.** In der Umgebung des an C30 angekoppelten 4-PAM-Rests konnte eine HC-ähnliche Struktur identifiziert werden, bestehend aus A23, A24 und A28, die zu einer Reduzierung von  $k_{\text{fast}}$  geführt haben könnte (Abb. A. 17). Da bei dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat im Vergleich zu 4-PAM-HDAH-S20C kein umgebendes Histidin identifiziert werden konnte, welches für die erhöhte Stabilisierung des *cis*-4-PAM-Rests (Typ 2,  $k_{\text{slow}}$ ) verantwortlich sein könnte, wurde angenommen, dass die zwischen N25 (Donor -NH, Peptidbindung) und der Maleimidgruppe von 4-PAM (Sauerstoffatom, fungierend als Akzeptor) identifizierte Wasserstoffbrückenbindung für die gesteigerte Stabilisierung verantwortlich

war. Interessanterweise konnte bei Vergleich der Amplitudenanteile festgestellt werden (Tab. 15 & Tab. 18), dass der Anteil von  $k_{\text{slow}}$  bei allen detektierten zweiphasigen Relaxationskinetiken der 4-PAM/HDAH-Konjugate (Wt, S20C, S20C-H35S und M30C) den größten Anteil darstellte. Resultierend daraus konnten insbesondere die Typ 2 Interaktionen als hauptsächliche Wechselwirkungen identifiziert werden.

Für den hochspekulativen Nachweis eines temporär negativ geladenen 4-PAM-Übergangszustands, welcher während der *cis*-zu-*trans* Relaxation an der Azo-Gruppe ausgebildet werden könnte<sup>62</sup>, wurde die 4-PAM/HDAH-H35D-Variante eingesetzt. Eine ionische Interaktion mit einem protonierten Histidinrest könnte zusätzlich dazu beitragen, die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation zu verlangsamen. Da für das 4-PAM/HDAH-H35D-Konjugat nur eine einphasige thermische *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetik nachweisbar war, wurde angenommen, dass durch die Abstoßungsreaktion gleicher Ladungen zwischen D und dem negativ geladenen Übergangszustand des angekoppelten 4-PAM-Rest, das zweiphasige Verhalten unterbunden und demzufolge eine Stabilisierung des Übergangszustands verhindert wurde. Da die D-Substitution, verglichen mit den  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werten der unmodifizierten HDAH-S20C-Referenz, vermutlich zu einer Konformationsänderung der Proteinstruktur führte, wäre eine rationale Interaktionsuntersuchung, bei der beide Interaktionspartner räumlich zueinander ausgerichtet sein müssten, nicht möglich und die Annahme von möglichen Abstoßungsreaktion äußerst spekulativ.

### 5.6.1. Zusammenfassung

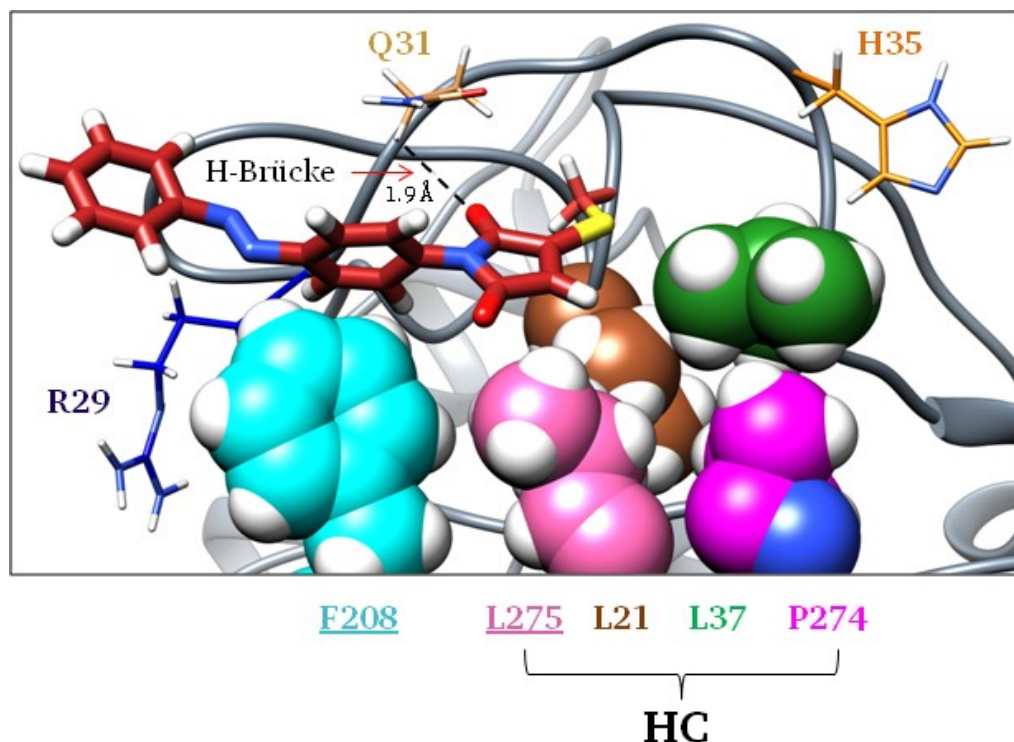
Der postulierte Photoschaltungsmechanismus zwischen den beiden 4-PAM Isomeren an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche wurde für die *cis*- (Abb. 35) und die *trans*-Konfiguration (Abb. 36) nachfolgend zusammengefasst.



HDAH-S20C-Varianten		Mutationsabhängige Photoschaltungseffizienz / %	
HC	L21	A = 19	S = 0
	L37	A = 34	S = 0
	P274	T = 0	S = 0
	L275	A = 0	S = 0
	H35	D = 0	S = 34

**Abb. 35: Postulierter Photoschaltungsmechanismus von *cis*-4-PAM an der Proteinoberfläche von HDAH-S20C.** Die durch UV-A Bestrahlung erzeugte *cis*-Konfiguration von 4-PAM wird durch den hydrophoben Cluster (HC) und H35 stabilisiert. Die nachgewiesene zweiphasige Kinetik, bestehend aus den Ratenkonstanten  $k_{\text{fast}}$  und  $k_{\text{slow}}$ , beschreibt unterschiedlich stattfindende intermolekulare Interaktionen des Typ 1 und Typ 2. Existierende Dipol-Dipol Wechselwirkungen (WW) wurden durch die HDAH-Variante H35S bestätigt ( $t_{1/2} = 13$  h). Die vermutlich von H35 zusätzlich zur Verfügung gestellten Typ 2 Interaktionen (Ion-Dipol und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion) führen zu einer verstärkten *cis*-4-PAM-Stabilisierung um das 2.2-fache ( $t_{1/2} = 29$  h). Im Vergleich zu  $k_{\text{fast}}$  nimmt  $k_{\text{slow}}$  den größeren Anteil (Amplitude) bei der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetik ein. Der Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf die Photoschaltungseffizienz ist in der aufgeführten Tabelle zusammengefasst.

Durch Bestrahlung mit Blaulicht kann der stabilisierte *cis*-4-PAM-Zustand (Abb. 35) in den fixierten *trans*-Zustand überführt werden (Abb. 36).



**Abb. 36:** Postulierter Photoschaltungsmechanismus von *trans*-4-PAM an der Proteinoberfläche von HDAH-S20C. Die durch Blaulichtbestrahlung erzeugte *trans*-Konfiguration von 4-PAM wird durch hydrophobe Interaktionen zwischen L275 und F208 und insbesondere durch eine Wasserstoffbrückenbindung (H-Brücke) zwischen Q31 (Donor -NH, Peptidbindung) und der Maleimidgruppe (Sauerstoffatom, Akzeptor) stabilisiert. Der HC wurde abgebildet, um die Konformationsänderung von dem *cis*- (Abb. 35) in den *trans*-Zustand zu verdeutlichen.

Aufgrund der zentralen Lage von L275 zu den beiden 4-PAM-Isomeren wurden vor allem Interaktionen mit der Maleimidgruppe nachgewiesen. Basierend darauf wird für L275 angenommen, dass diese Aminosäure, neben der tragenden Funktion als Koordinationsbestandteil für die HC-Ausbildung, eine wichtige Rolle bei der Fixierung der *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration einnimmt. Die Aufgabe hierbei wäre die Rotation der Maleimidgruppe um die Thioetherbindung (in gelb dargestellt) zu unterbinden bzw. einzuschränken.

## 5.7. Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität durch AMDs

Bereits kleinste Distanzverlängerungen führten zu einem inversen (HDAH-M30C, AMD **1a**) oder gleichbleibenden Photoschaltungsverhalten (HDAH-M30C, AMD **1b**) gegenüber dem am kürzesten eingesetzten Azobenzol-Maleimid-Derivats (4-PAM). Mit zunehmender Alkylspacerlänge konnte auch eine fast vollständige, irreversible Inhibierung der HDAH-M30C Aktivität nachgewiesen werden (AMD **1c-e**). **Die durch die AMDs 1c-e fast vollständig verursachte Inhibierung der HDAH-M30C Aktivität wurde auf eine sterische Blockierung des Aktivkanaleingangs zurückgeführt.** Abgeleitet von der MD-Simulation für das *trans*-4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat wäre denkbar, dass der flexible Alkylspacer und die endständigen Phenylgruppen, inklusive der Azogruppe, intermolekulare Interaktionen mit den Aktivkanal bildenden Aminosäuren eingehen könnten. Da innerhalb des Aktivkanals Aminosäuren mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften lokalisiert sind,<sup>99</sup> würde eine Stabilisierung beider Konfiguration (*cis/trans*) positiv beeinflusst werden und demnach ist eine reversible Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität nicht mehr möglich. Aufgrund der für AMD **1c-e** vorherrschenden, endständigen Schwerpunktverlagerung des mechanisch und polaritätsabhängig induzierten *cis/trans*-Isomerisierungseffekts auf angrenzende Proteinstrukturen, konnte vermutlich eine reversible Photoschaltung der HDAH-M30C Aktivität durch Alkylspacer mit  $n \geq 3$  nicht mehr ausgeübt werden. **Während die Photoschaltung von 4-PAM nur zu einer Änderung von  $V_{\max}$  führte, wurde durch die distanzverlängerten AMDs 1a und b beide Parameter ( $V_{\max}$  und  $K_m$ ) signifikant beeinflusst.** Je nach räumlicher und distanzabhängig möglicher Anlagerung von AMD-**1a** und **b** an die flexible Schleifenregion (Aminosäure 16-38) sowie einer durch *cis/trans*-Isomerisierung hervorgerufenen Polaritätsänderung, könnten unterschiedliche Konformationsänderungen der Schleifenstruktur hervorgerufen und gegensätzliche Schaltungsverhalten induziert werden. **Dass sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Konfiguration die Rolle des aktiveren bzw. inaktiveren Konjugats einnehmen kann, konnte auch bei der Photokontrolle eines iGluR6 in Abhängigkeit von fünf verschiedenen Cysteinmodifikationsstellen sowie drei getesteten photoschaltbaren MAGs aufgezeigt werden.**<sup>85</sup>

Auch wenn die Photoschaltungseffizienzen von dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat durch die AMD **1a-e** Modifikationen nicht optimiert werden konnte, stellen die längenunterschiedlichen AMDs (**1a-e**) eine interessante Möglichkeit zur allgemeinen Generierung von photoschaltbaren Proteinkonjugaten dar. Durch die Ergänzung um 4-PAM könnte das AMD-Modifikationsset als Utensil eingesetzt werden, um systematisch geeignete Cysteinmodifikationsstellen zur Photoschaltung bestimmter Proteinfunktionen zu identifizieren sowie eine räumliche und optimale Ausrichtung des Photoschalters zum Aktivzentrum zu untersuchen. Prinzipiell könnte diese Methode und damit der Transfer von

Photoschaltungseigenschaften auf andere Proteine übertragen werden, die lösungsmittelzugängliche Cysteine an den zu kontrollierenden Proteinregionen aufweisen.<sup>17</sup>

## 5.8. Auswirkung des photostationären Zustands auf die Photoschaltungseffizienz

Für eine Bewertung der maximal möglichen Photoschaltungseffizienz für die 4-PAM bzw. AMD/HDAH-Konjugate wurden die für 4-PAM ermittelten PSS herangezogen (Tab. 10). Aufgrund der Tatsache, dass die Photoschaltungseffizienz von den 4-PAM/HDAH M30C und S20C Konjugaten (Abb. 25 A/B) durch eine längere Bestrahlungszeit (60 min) nicht gesteigert werden konnte, wurden für die Berechnung der  $V_{\max}$ -Werte die PSS nach 25 min Bestrahlung verwendet. Bezüglich einer 60 minütigen UV-A und Blaulichtbestrahlung der 4-PAM/DMSO-Lösungen mit den Handlampen (Kap. 3.2.8.1) wurden im Vergleich zu Gorostiza *et al.*<sup>46,141</sup> sowie Harvey & Trauner<sup>137</sup> ähnliche PSS bestimmt. Unter der Annahme, dass die in DMSO bestimmten PSS von 4-PAM auf die photoschaltbaren HDAH-Konjugate in einem wässrigen Milieu (MK-Puffer) übertragen werden können, wurden folgende  $V_{\max}$ -Werte für 100 % *cis*- sowie die entsprechende *trans*-Konfiguration für AMD/HDAH-Konjugate abgeleitet. Für das *cis*-AMD **1a**/HDAH-M30C-Konjugat wurden  $0.35 \text{ nM s}^{-1}$  und für *trans*  $4.59 \text{ nM s}^{-1}$  berechnet. Das *cis*-AMD **1b**/HDAH-M30C-Konjugat hingegen wurde mit  $6.47 \text{ nM s}^{-1}$  und die *trans*-Konfiguration mit  $0.02 \text{ nM s}^{-1}$  bestimmt.<sup>17</sup> Für die 4-PAM-HDAH-Konjugate konnten folgende  $V_{\max}$ -Werte berechnet werden: M30C (*cis* =  $5.96 \text{ nM s}^{-1}$  / *trans* =  $0.11 \text{ nM s}^{-1}$ ) und S20C (*cis* =  $10.13 \text{ nM s}^{-1}$  / *trans* =  $1.43 \text{ nM s}^{-1}$ ). Im direkten Vergleich zu den experimentell beobachteten Photoschaltungseffizienzen würde unter Berücksichtigung des jeweiligen PSS das Photoschaltungsverhalten nach vollständiger Isomerisierung erheblich gesteigert werden. Die beobachteten (beob.) und die theoretisch möglichen (theor.) Werte werden nun einander gegenübergestellt: AMD **1a**/M30C (beob. 35 %, theor. 92 %), AMD **1b**/M30C (beob. 54 %, theor. 99 %), 4-PAM/M30C (beob. 50 %, theor. 98 %) und 4-PAM/S20C (beob. 40 %, theor. 86 %). Die theoretisch kalkulierten Werte würden implizieren, dass durch den Einsatz und die vollständige Photoisomerisierung in die jeweiligen *cis/trans*-Isomere eines monofunktionalen Azobenzolderivats, nahe des Aktivkanals, eine fast vollständige und reversible Schaltung der HDAH-Aktivität erreicht werden könnte. Bezugnehmend auf die theor. kalkulierten Werte für die HDAH-Varianten M30C und S20C würde allerdings die *cis*-4-PAM (100 %) Isomerisierung im Vergleich zu den jeweils unmodifizierten Proben zu einer erheblichen Steigerung der Grundenzymaktivität führen (M30C = 90 %, S20C = 33 %). Da die Möglichkeit einer signifikanten Enzymaktivitätssteigerung durch *cis*-4-PAM ausgeschlossen wurde, ist anzunehmen, dass der tatsächlich generierte *cis*-4-PAM-Anteil an HDAH-Konjugaten im wässrigen System und bei möglicherweise niedrigeren eingesetzten Probenkonzentrationen nahe zu vollständig gebildet wurde. Dies würde gegen den in DMSO



bestimmten PSS für *cis*-4-PAM und gleichzeitig gegen die theor. kalkulierten Werte bei einem Szenario von 100 % *cis*- bzw. *trans*-4-PAM sprechen, welches auf AMD-Konjugate übertragen wurde.<sup>17</sup> Gerade bei Vergleich zwischen der unmodifizierten HDAH-M30C und dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat (Tab. 14) fällt auf, dass beide Proben trotz 4-PAM-Modifikation eine ähnliche Aktivität aufwiesen. Denn durch Miteinbeziehung der in DMSO ermittelten PSS (53.5 % *cis* / 46.5 % *trans*) nach 25 min UV-A Bestrahlung müsste die Aktivität des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats normalerweise um knapp die Hälfte reduziert vorliegen - aufgrund des 46.5 %igen *trans*-Anteils, der sterisch inhibierend wirkt. Dass der *cis*-4-PAM-Anteil durch UV-A Bestrahlung (25 min) jedoch bei einer 50-fach geringer konzentrierten 4-PAM/DMSO-Lösung (0.1 mM) von 53.5 % (5 mM 4-PAM-Lösung, Tab. 10) auf ca. 95 % gesteigert werden konnte (Christiane Wolff, unveröffentlichte Ergebnisse), spricht für das Vorhandensein eines nahezu vollständigen *cis*-Isomeranteils und würde die ausbleibende Inaktivierung des 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats durch UV-A Bestrahlung in wässriger Lösung erklären. Dieser Sachverhalt kann durch Berechnung des *cis*-Isomeranteils in einer relativ gering konzentrierten 4-PAM/DMSO-Lösung (40  $\mu$ M), welche 25 min mit UV-A Licht bestrahlt wurde, unterstützt werden (Abb. 17 A). Bei Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für die  $n\text{-}\pi^*$ -Absorptionsbande von *cis*-Azobenzol ( $\epsilon = 1470 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>42</sup> konnte ein *cis*-Isomeranteil von  $\sim 98 \%$  berechnet werden. Dafür würde auch sprechen, dass die UV-A und Blaulichtbestrahlungen von 4-PAM bzw. AMD/HDAH-Konjugaten für die Bestimmung von Michaelis-Menten Kinetiken mit 1  $\mu$ M Lösungen durchgeführt wurde. Basierend auf dieser Erkenntnis entspricht eine durch 4-PAM bzw. AMD-Modifikation verursachte Reduzierung von  $V_{\max}$  und einer simultanen Steigerung des  $K_m$ -Werts, der tatsächlichen vorliegenden sterischen Hinderung, in Abhängigkeit unterschiedlicher Cystein-Ankopplungsstellen (z. B. 4-PAM/HDAH-S20C & M150C: Tab. 14, AMD/HDAH-M30C: Tab. A. 6) und ist nicht Ursache des vermeintlich bestimmten PSS (Tab. 10). **Diese zuvor beschriebenen Sachverhalte gehen einher mit der in Kap. 4.4.5 aufgezeigten Beobachtung, dass trotz Steigerung des *cis*-4-PAM-Anteils durch längere Bestrahlungszeit (60 min) keine Zunahme der Photoschaltungseffizienz nachgewiesen werden konnte und infolge dessen der generierte *trans*-Anteil die Photoschaltungseffizienz bestimmt. Demzufolge wäre eine theoretisch Photoschaltungseffizienz von  $\geq 75 \%$  möglich, welche experimentell zu maximal 50 % nachgewiesen wurde.** Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass nach Biokonjugation von 4-PAM an HDAH-Varianten, insbesondere die Ausbildung der *trans*-Konfiguration, bspw. durch eingeschränkte räumliche Konformationsänderung oder verstärkte Interaktion von *trans*-4-PAM mit der Proteinoberfläche gehindert wird. Dieser Sachverhalt wurde in ähnlicher Weise für die Photokontrolle der Enzymaktivität ( $\sim 50 \%$ ) einer Rinder-Carboanhydrase II diskutiert, wobei sich die PSS des Photoschalters nach Biokonjugation an das Enzym im Vergleich zu dem ungebundenen Molekül signifikant änderten.<sup>141</sup> Möglicherweise könnte auch die nachgewiesene Photoschaltungseffizienz von

50 % bereits die maximal erreichbare Photoschaltung der Enzymaktivität sein, basierend auf der 4-PAM-Modifikation selbst, die eine Ausbildung von zwei möglichen unterschiedlichen 4-PAM-(*R/S*)-Stereoisomerkonjugaten hervorruft. Da generell für die Ausführung der Photoschaltung die räumliche Ausrichtung zum Aktivkanal essentiell ist, könnte eines der Stereoisomere ausreichen, um einem Verlust der Schaltbarkeit zwischen den beiden Konfigurationen zu erzeugen, indem eines der beiden Stereoisomere für die *cis*- bzw. *trans*-Konfigurationsschaltung favorisiert wird.<sup>85</sup> Um allerdings eindeutig die tatsächlich vorliegenden Photoschaltungseffizienzen quantifizieren zu können, müssten die PSS von 4-PAM oder AMDs in einem wässrigen Puffersystem und zusätzlich an den jeweiligen HDAH-Konjugaten gemessen werden. Dies war experimentell mittels NMR-Spektroskopie und aufgrund von Konzentrations- bzw. Löslichkeitsproblemen nicht möglich.

Bezüglich der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für 4-PAM und AMDs (**1a-e**) wurden einstellig mikromolare Werte nachgewiesen, welche sich in Abhängigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung nicht signifikant unterschieden. Unter Verwendung des PSS, welcher durch UV-A Bestrahlung (25 min) in DMSO mit 53.5 % *cis* / 46.5 % *trans* bestimmt wurde, würden sich die IC<sub>50</sub>-Werte zwischen der jeweiligen *cis*- und *trans*-Konfiguration nach Berechnung von 100 % *cis*-Isomer tendenziell unterscheiden (Tab. 20). **Letzteres würde jedoch weiterhin zur Bestimmung von einstelligen mikromolaren Werten führen und die entsprechende *cis*-Konfiguration von 4-PAM und den AMDs (1a-e) im Vergleich zu SAHA (38 nM) demnach keinen nennenswerten inhibierenden Effekt auf die HDAH-C51S Aktivität darstellen.** Zur Erzeugung der *trans*-Konfiguration (nahezu 100 %) wurden die getesteten Azobenzol-Maleimid-Derivate 5 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Wahl einer Inkubationszeit von 5 h basierte auf der für 4-PAM ermittelten Halbwertszeit von ~ 35 min, die für den thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationsprozess bestimmt wurde. Hierbei wurde angenommen, dass eine Inkubationszeit um das 8.6-fache der Halbwertszeit zu einer nahezu vollständigen Bildung der *trans*-Konfiguration führte.

---

## 5.9. $V_{\max}$ als geeigneter Parameter zur Bestimmung der Photoschaltungseffizienz

---

Um die Katalyse von einem bestimmten Substrat zwischen zwei unterschiedlichen Enzymen, z.B. generiert durch ortsspezifisch Mutagenese oder durch chemische Modifikation, vergleichen zu können, wird oft die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) als maßgebender Parameter verwendet.  $k_{\text{cat}}$  bezeichnet als katalytischer Parameter die Molekülumsatzrate pro Aktivzentrum und kann aus  $V_{\max}$  und der eingesetzten Enzymkonzentration  $[E_0]$  berechnet werden ( $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E_0]$ ). Es wird allerdings von einer allgemeinen Verwendung von  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  als Vergleichsparameter zur Quantifizierung enzymatisch katalysierter Reaktionen abgeraten, da unter bestimmten Bedingungen eine Darstellung von  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  nicht nur inkorrekt sondern auch irreführend sein kann.<sup>145</sup> Dies betrifft insbesondere Enzyme mit

---



unterschiedlichen  $K_m$ -Werten. Denn es ist generell möglich, dass ein Enzym mit einer höheren katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) bei bestimmten Substratkonzentrationen  $[S]$  die identische enzymatische Reaktion bei niedrigeren Umsatzraten katalysieren kann als vergleichsweise ein Enzym mit einem niedrigeren  $k_{cat}/K_m$ -Wert. Auch wenn das Enzym mit dem höheren  $k_{cat}/K_m$ -Wert die Reaktion schneller zu katalysieren vermag, so entspricht das Verhältnis der Reaktionsraten keiner Konstanten, sondern ist abhängig von dem  $[S]/K_m$ -Verhältnis. Dies konnte anhand der AMD **1a-b**/HDAH-M30C-Konjugate signifikant demonstriert werden, deren  $V_{max}$  als auch  $K_m$ -Wert gleichzeitig durch *cis/trans*-Isomerisierung verändert wurde. Basierend auf den unterschiedlich nachgewiesenen  $K_m$ -Werten führten zunehmende Substratkonzentrationen bei dem AMD **1a**/HDAH-M30C-Konjugat zu einer Steigerung der Photoschaltungseffizienz (Abb. A. 14 A), während AMD **1b** ein inverses Verhalten aufwies (Abb. A. 14 B). Eine gleichbleibende Photoschaltung der AMD-Konjugat Aktivitäten (**1a** und **1b**) wurde erst bei Substratsättigung ( $V_{max}$ ) erzielt. Ganz im Gegenteil dazu konnte bei dem 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat, dessen  $K_m$ -Wert sich durch *cis/trans*-Photoisomerisierung nicht änderte, bei jeder beliebigen Substratkonzentration eine konstante Photoschaltungseffizienz nachgewiesen werden (Abb. A. 14 C). Obwohl über den ganzen getesteten Substratkonzentrationsbereich kein Schnittpunkt der Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM oder AMD/HDAH-Konjugaten in *cis*- und *trans*-Konfiguration nachgewiesen werden konnte, spiegelten die drei Photoschaltungseffizienzverhalten (Abb. A. 14 A2-C2) in ähnlicher Art und Weise die von Eisenthal *et al.*<sup>145</sup> beschriebenen Fallbeispiele wieder:

$$\text{AMD } \mathbf{1a} \text{ (A2): } K_m^{trans} > (k_{cat}^{trans}/k_{cat}^{cis}) * K_m^{cis}$$

$$\text{AMD } \mathbf{1b} \text{ (B2): } K_m^{cis} < (k_{cat}^{cis}/k_{cat}^{trans}) * K_m^{trans}$$

$$\text{4-PAM (C2): } K_m^{cis} = K_m^{trans}$$

Begründet anhand der aufgezeigten Beispiele (Abb. A. 14) konnte  $V_{max}$  als die maßgebende und geeignete Kenngröße für die Quantifizierung von Photoschaltungseffizienzen identifiziert werden, welche zudem in anderen Arbeiten für die Begutachtung der Aktivitätsschaltung eingesetzt wurde.<sup>83,88</sup> Generell wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass insbesondere die Aktivitätsänderung der 4-PAM/HDAH-Konjugate maßgeblich durch *cis/trans*-Isomerisierung des angekoppelten Azobenzolrests anhand der Änderung von  $V_{max}$  (Tab. 14 & Tab. 17) und nicht in der Änderung des  $K_m$ -Werts gemessen werden konnte.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des hessischen Forschungsförderprogramm LOEWE mit dem Schwerpunkt „*Soft Control: Mit Polymeren an Grenzflächen Funktionen effizient Schalten*“ angefertigt. In diesem Kontext wurde die Entwicklung und Charakterisierung eines photoschaltbaren Biokatalysators (FB188 HDAH) durchgeführt, welcher durch *cis/trans* Photoisomerisierung eines monofunktionalen Azobenzol-Maleimid-Derivats (4-PAM) in einen aktiveren und inaktiveren Zustand überführt werden konnte. Das lichtschaltbare Element wurde selektiv und ortsspezifisch an unterschiedlich positionierte Cysteinreste nahe der Aktivkanaleintrittsfläche angekoppelt und die Photoschaltung anhand von Michaelis-Menten Parametern ( $K_m$  und  $V_{max}$ ) quantifiziert.

In diesem Zusammenhang konnten drei photoschaltbare HDAH-Varianten entwickelt werden (HDAH S20C, M30C und M150C), die sich in ihrer Photoschaltungseffizienz ( $M30C > S20C > M150C$ ) unterschieden. Die maximal erreichbare Photoschaltungseffizienz betrug 50 % (HDAH M30C), wobei die *cis*-Konfiguration die HDAH aktivierte und die *trans*-Konfiguration zu einer Inaktivierung führte. Darüber hinaus konnte die HDAH-Aktivität in mehreren alternierenden UV/VIS-Bestrahlungszyklen ohne Einflussnahme auf die Enzymaktivität photogeschaltet und während sowie nach dem Photoschaltungsprozess keine Photozerstörung von 4-PAM nachgewiesen werden. In Bezug auf die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von nicht-modifizierten 4-PAM (einphasige Kinetik) konnte an den HDAH-Varianten eine außergewöhnlich starke Verlangsamung der Relaxationsgeschwindigkeit (zweiphasige Kinetik) festgestellt werden, welche im Maximum (HDAH M30C) um das  $\sim 50$ -fache ( $t_{1/2} = \sim 30$  h) reduziert wurde. Dieses besondere Merkmal ermöglichte die initiale Aktivierung des 4-PAM/HDAH-Konjugats durch einen einzigen Lichtpuls und die Aufrechterhaltung des enzymatisch aktiveren Zustands ohne kontinuierliche UV-Bestrahlung.

Als Ursache für die starke Verlangsamung der *cis*-zu-*trans* Relaxation wurde eine Stabilisierung der *cis*-Konfiguration oder dessen Übergangszustandes an der Proteinoberfläche angenommen. Dies konnte anhand von MD-Simulationen sowie einer dazu systematischen Mutagenese-Studie an der HDAH S20C-Variante bestätigt werden. Hierbei wurde vor allem ein prominentes Histidin (H35) identifiziert, welches für die außerordentliche Stabilisierung verantwortlich war sowie die Beteiligung eines hydrophoben Clusters, bestehend aus den Aminosäuren L21, L37, P274 und L275, dessen Koordination eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der maximalen Photoschaltungseffizienz darstellte. Als involvierte intermolekulare Interaktionen zwischen dem an HDAH angekoppelten 4-PAM und relevanten Aminosäuren konnten polare, hydrophobe und vermutlich aromatische  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen abgeleitet werden.

Eine signifikante Verbesserung der Photoschaltungseffizienz der HDAH-M30C Variante (50 %) konnte durch die neuartig synthetisierten AMD-Derivate, die Alkylspacer erweiterte 4-PAM Moleküle darstellen, nicht erzielt werden. Im Gegenzug jedoch wurde ein Alkylspacerlängen-abhängiges Verhalten auf die Enzymaktivität beobachtet, wobei AMD **1a** zu einem enzymatisch inversen Schaltverhalten (*trans* = aktiver, *cis*=inaktiver) und AMD-Derivate mit Alkylspacern  $\geq 3$  zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der HDAH-Aktivität führten. Ergänzend zu den photoschaltbaren  $V_{\max}$ -Werten zeigten die  $K_m$ -Werte ebenfalls eine signifikante Photokontrolle. Darüber hinaus konnten, im Vergleich zu dem anerkannten HDAC/HDAH-Inhibitor SAHA, alle in dieser Arbeit getesteten Azobenzolderivate (4-PAM und AMD **1a-e**) und dessen Isomere als nicht-potent inhibitorische Substanzen eingestuft werden.

Insbesondere die aus der vorliegenden Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass Histidin an der Stabilisierung der thermodynamisch labilen *cis*-Konfiguration beteiligt ist, könnte für das rationale Design von neuartigen, biologisch photoschaltbaren Systemen eingesetzt werden. Durch diese Eigenschaft wäre es möglich, die durch die *cis*-Konfiguration vermittelte Funktion über einen längeren Zeitraum ( $t_{1/2} \geq \sim 30$  h) aufrechtzuerhalten und jene durch einen einzigen Lichtimpuls zu aktivieren. Eine permanente UV-Bestrahlung wäre demnach nicht notwendig. Generell denkbar wäre in diesem Zusammenhang Histidine ortsspezifisch in Nachbarschaft zu dem angekoppelten, monofunktionalen Azobenzolderivat einzuführen und darüber eine Langzeitstabilisierung des metastabilen *cis*-isomers zu induzieren.

Um die Photoschaltungseffizienz von HDAH-Varianten zu steigern ( $> 50$  %) wäre, im Vergleich zu 4-PAM und den AMDs **1a-e**, die Anwendung eines monofunktionalen, reversibel photoschaltbaren Azobenzolderivats, basierend auf dem PTL-Prinzip denkbar. Hierfür könnte als ein relativ stark zinkbindender Ligand Hydroxamsäure oder eine vergleichsweise schwächere Carboxylfunktion eingesetzt werden. Dies entspräche dem Konzept eines reversibel photoschaltbaren Inhibitors, kovalent gekoppelt an HDAH.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Arnon, D. I. (1959).** Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature*. **184**, 10-21.
2. **Feher, G., Allen, J. P., Okamura, M. & Rees, D. (1989).** Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature*. **339**, 111–116.
3. **Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1973).** Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. **70**, 2853–2857.
4. **Hargrave, P. & McDowell, J. (1992).** Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J*. **6**, 2323–2331.
5. **Lemke, H.-D. & Oesterhelt, D. (1981).** Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett*. **128**, 255–260.
6. **Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. & Dixon, R. A. (1994).** Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. **63**, 101–132.
7. **Lanyi, J. K. (2004).** Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol*. **66**, 665–688.
8. **Kühlbrandt, W. (2000).** Bacteriorhodopsin—the movie. *Nature*. **406**, 569–570.
9. **Feldbauer, K., Zimmermann, D., Pintschovius, V., Spitz, J., Bamann, C. & Bamberg, E. (2009).** Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**, 12317–12322.
10. **Aizawa, M., Namba, K. & Suzuki, S. (1977).** Light-induced enzyme activity changes associated with the photoisomerization of bound spiropyran. *Arch Biochem Biophys*. **182**, 305–310.
11. **Aizawa, M., Namba, K. & Suzuki, S. (1977).** Photo control of enzyme activity of  $\alpha$ -amylase. *Arch Biochem Biophys*. **180**, 41–48.
12. **James, D. A., Burns, D. C. & Woolley, G. A. (2001).** Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues. *Protein engineering*. **14**, 983–991.
13. **Willner, I., Lion-Dagan, M., Rubin, S., Wonner, J., Effenberger, F. & Bäuerle, P. (1994).** PHOTOREGULATION OF  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN ACTIVITY IN ORGANIC MEDIA: EFFECTS OF BIOIMPRINTING. *Photochem Photobiol*. **59**, 491–496.
14. **Willner, I., Rubin, S. & Riklin, A. (1991).** Photoregulation of papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone. *J Am Chem Soc*. **113**, 3321–3325.
15. **Broichhagen, J., Jurastow, I., Iwan, K., Kummer, W. & Trauner, D. (2014).** Optical Control of Acetylcholinesterase with a Tacrine Switch. *Angew Chem Int Ed Engl*. **53**, 7657-7660.
16. **Korbus, M., Balasubramanian, G., Müller-Plathe, F., Kolmar, H. & Meyer-Almes, F.-J. (2014).** Azobenzene switch with a long-lived cis-state to photocontrol the enzyme activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase. *Biol Chem*. **395**, 401-412.

17. Horstmann, B., Korbus, M., Friedmann, T., Wolff, C., Thiele, C. & Meyer-Almes, F.-J. (2014). Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase. *Bioorg Chem.* **57**, 155-161.
18. Lin, W.-C., Davenport, C. M., Mourot, A., Vytla, D., Smith, C. M., Medeiros, K. A., Chambers, J. J. & Kramer, R. H. (2014). Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. *ACS Chem Biol.* **9**, 1414-1419.
19. Al-Atar, U., Fernandes, R., Johnsen, B., Baillie, D. & Branda, N. R. (2009). A photocontrolled molecular switch regulates paralysis in a living organism. *J Am Chem Soc.* **131**, 15966–15967.
20. Beharry, A. A., Wong, L., Tropepe, V. & Woolley, G. A. (2011). Fluorescence imaging of azobenzene photoswitching in vivo. *Angew Chem.* **123**, 1361–1363.
21. de las Heras Alarcón, C., Pennadam, S. & Alexander, C. (2005). Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chem Soc Rev.* **34**, 276–285.
22. Hoffman, A. S. (2000). Bioconjugates of intelligent polymers and recognition proteins for use in diagnostics and affinity separations. *Clin Chem.* **46**, 1478–1486.
23. Shimoboji, T., Larenas, E., Fowler, T., Kulkarni, S., Hoffman, A. S. & Stayton, P. S. (2002). Photoresponsive polymer-enzyme switches. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**, 16592–16596.
24. Raymo, F. M. & Tomasulo, M. (2006). Optical processing with photochromic switches. *Chemistry.* **12**, 3186–3193.
25. Szymanski, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A., Velema, W. A. & Feringa, B. L. (2013). Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem Rev.* **113**, 6114-6178
26. Bouas-Laurent, H. & Dürr, H. (2001). Organic photochromism (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem.* **73**, 639–665.
27. Beharry, A. A. & Woolley, G. A. (2011). Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem Soc Rev.* **40**, 4422–4437.
28. Merino, E. & Ribagorda, M. (2012). Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. *Beilstein J Org Chem.* **8**, 1071–1090.
29. Berkovic, G., Krongauz, V. & Weiss, V. (2000). Spiropyrans and spirooxazines for memories and switches. *Chem Rev.* **100**, 1741–1754.
30. Waldeck, D. H. (1991). Photoisomerization dynamics of stilbenes. *Chem Rev.* **91**, 415–436.
31. Irie, M. (2000). Diarylethenes for memories and switches. *Chem Rev.* **100**, 1685–1716.
32. Yokoyama, Y. (2000). Fulgides for memories and switches. *Chem Rev.* **100**, 1717–1740.
33. Steinle, W. & Rück-Braun, K. (2003). Synthesis and characterization of novel bifunctional hemithioindigo chromophores. *Org Lett.* **5**, 141–144.

- 
34. Babii, O., Afonin, S., Berditsch, M., Reißer, S., Mykhailiuk, P. K., Kubyshkin, V. S., Steinbrecher, T., Ulrich, A. S. & Komarov, I. V. (2014). Controlling Biological Activity with Light: Diarylethene-Containing Cyclic Peptidomimetics. *Angew Chem int Ed.* **53**, 3392–3395.
  35. Sakata, T., Yan, Y. & Marriott, G. (2005). Optical switching of dipolar interactions on proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 4759–4764.
  36. Loughheed, T., Borisenko, V., Hennig, T., Rück-Braun, K. & Woolley, G. A. (2004). Photomodulation of ionic current through hemithioindigo-modified gramicidin channels. *Org Biomol Chem.* **2**, 2798–2801.
  37. Letsinger, R. L. & Wu, T. (1995). Use of a stilbenedicarboxamide bridge in stabilizing, monitoring, and photochemically altering folded conformations of oligonucleotides. *J Am Chem Soc.* **117**, 7323–7328.
  38. Willner, I. & Rubin, S. (1996). Steuerung der Struktur und Funktion von Biomakromolekülen durch Licht. *Angew Chem* **108**, 419–439.
  39. Garcia-Amorós, J. & Velasco, D. (2012). Recent advances towards azobenzene-based light-driven real-time information-transmitting materials. *Beilstein J Org Chem.* **8**, 1003–1017.
  40. Ward, M. A. & Georgiou, T. K. (2011). Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers* **3**, 1215–1242.
  41. Gorostiza, P. & Isacoff, E. Y. (2008). Nanoengineering ion channels for optical control. *Physiology* **23**, 238–247.
  42. Rau, H. (1973). Spectroscopic properties of organic azo compounds. *Angew Chem Int Ed Engl.* **12**, 224–235.
  43. Rau, H. (2003). Azo compounds. in: *Photochromism: molecules and systems*, Dürr, H., Bouras-Laurant, H., Hrsg., Elsevier, Msterdam, NL
  44. Knoll, H. (2003). Photoisomerism of Azobenzenes. in: *CRC handbook of organic photochemistry and photobiology*, Second Edition, Horspool, W., Lenci, F., Hrsg., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
  45. Hartley, G. (1937). The cis-form of azobenzene. *Nature* **140**, 281.
  46. Gorostiza, P., Volgraf, M., Numano, R., Szobota, S., Trauner, D. & Isacoff, E. Y. (2007). Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**, 10865–10870.
  47. Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R. H., Isacoff, E. Y. & Trauner, D. (2005). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol.* **2**, 47–52.
  48. Sadowski, O., Beharry, A. A., Zhang, F. & Woolley, G. A. (2009). Spectral tuning of azobenzene photoswitches for biological applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* **48**, 1484–1486.
-



- 
49. **Malkin, S. & Fischer, E. (1962).** TEMPERATURE DEPENDENCE OF PHOTOISOMERIZATION. PART II. <sup>1</sup> QUANTUM YIELDS OF cis $\rightleftharpoons$  trans ISOMERIZATIONS IN AZO-COMPOUNDS. *J Phys Chem A*. **66**, 2482–2486.
  50. **Bandara, H. D. & Burdette, S. C. (2012).** Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chem Soc Rev*. **41**, 1809–1825.
  51. **Chi, L., Sadovski, O. & Woolley, G. A. (2006).** A blue-green absorbing cross-linker for rapid photoswitching of peptide helix content. *Bioconjug Chem*. **17**, 670–676.
  52. **Volgraf, M., Gorostiza, P., Szobota, S., Helix, M. R., Isacoff, E. Y. & Trauner, D. (2007).** Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J Am Chem Soc*. **129**, 260–261.
  53. **Zhang, J., James, D. & Woolley, G. (1999).** PATIC: a conformationally constrained photoisomerizable amino acid. *J Pept Res*. **53**, 560–568.
  54. **Fliegl, H., Köhn, A., Hättig, C. & Ahlrichs, R. (2003).** Ab initio calculation of the vibrational and electronic spectra of trans-and cis-azobenzene. *J Am Chem Soc*. **125**, 9821–9827.
  55. **Dokic, J., Gothe, M., Wirth, J., Peters, M. V., Schwarz, J., Hecht, S. & Saalfrank, P. (2009).** Quantum chemical investigation of thermal cis-to-trans isomerization of azobenzene derivatives: substituent effects, solvent effects, and comparison to experimental data. *J Phys Chem A*. **113**, 6763–6773.
  56. **Nägele, T., Hoche, R., Zinth, W. & Wachtveitl, J. (1997).** Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. *Chem Phys Lett*. **272**, 489–495.
  57. **Renner, C., Behrendt, R., Spörlein, S., Wachtveitl, J. & Moroder, L. (2000).** Photomodulation of conformational states. I. Mono- and bicyclic peptides with (4-amino) phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* **54**, 489–500.
  58. **Rau, H. (1984).** Further evidence for rotation in the  $\pi, \pi^*$  and inversion in the  $n, \pi^*$  photoisomerization of azobenzenes. *Journal of photochemistry*. **26**, 221–225.
  59. **Monti, S., Orlandi, G. & Palmieri, P. (1982).** Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene. *Chemical Physics*. **71**, 87–99.
  60. **Ootani, Y., Satoh, K., Nakayama, A., Noro, T. & Taketsugu, T. (2009).** Ab initio molecular dynamics simulation of photoisomerization in azobenzene in the  $n \pi^*$  state. *J Chem Phys*. **131**, 194306.
  61. **Shin, D. M. & Whitten, D. G. (1988).** Solvent-induced mechanism change in charge-transfer molecules. Inversion versus rotation paths for the Z  $\rightarrow$  E isomerization of donor-acceptor substituted azobenzenes. *J Am Chem Soc*. **110**, 5206–5208.
  62. **Nishimura, N., Tanaka, T., Asano, M. & Sueishi, Y. (1986).** A volumetric study on the thermal cis-to-trans isomerization of 4-(dimethylamino)-4'-nitroazobenzene and 4, 4'-bis (dialkylamino) azobenzenes: evidence of an inversion mechanism. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1839–1845.
-

- 
63. Nishimura, N., Kosako, S. & Sueishi, Y. (1984). The thermal isomerization of azobenzenes. III: Substituent, solvent, and pressure effects on the thermal isomerization of push-pull azobenzenes. *Bull Chem Soc Jpn.* **57**, 1617–1625.
64. Satzger, H., Spörlein, S., Root, C., Wachtveitl, J., Zinth, W. & Gilch, P. (2003). Fluorescence spectra of trans and cis-azobenzene-emission from the Franck-Condon state. *Chem Phys Lett.* **372**, 216–223.
65. Lednev, I. K., Ye, T.-Q., Hester, R. E. & Moore, J. N. (1996). Femtosecond time-resolved UV-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene in solution. *J Phys Chem.* **100**, 13338–13341.
66. Bortolus, P. & Monti, S. (1979). Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects. *J Phys Chem.* **83**, 648–652.
67. Liang, X., Zhou, M., Kato, K. & Asanuma, H. (2013). Photoswitch nucleic acid catalytic activity by regulating topological structure with a universal supraphotoswitch. *ACS Synth Biol.* **2**, 194–202.
68. Wu, L., Koumoto, K. & Sugimoto, N. (2009). Reversible stability switching of a hairpin DNA via a photo-responsive linker unit. *Chem Commun.* 1915–1917.
69. Wang, Q., Yi, L., Liu, L., Zhou, C. & Xi, Z. (2008). A thermostable azo-linker for reversible photoregulation of DNA replication. *Tetrahedron Lett.* **49**, 5087–5089.
70. Chalker, J. M., Bernardes, G. J., Lin, Y. A. & Davis, B. G. (2009). Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J.* **4**, 630–640.
71. Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res.* **20**, 1325–1336.
72. Stephanopoulos, N. & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat Chem Biol.* **7**, 876–884.
73. Antos, J. M. & Francis, M. B. (2004). Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution. *J Am Chem Soc.* **126**, 10256–10257.
74. Obermeyer, A. C., Jarman, J. B. & Francis, M. B. (2014). N-Terminal Modification of Proteins with o-Aminophenols. *J Am Chem Soc.* **136**, 9572–9579.
75. Gilmore, J. M., Scheck, R. A., Esser-Kahn, A. P., Joshi, N. S. & Francis, M. B. (2006). N-Terminal Protein Modification through a Biomimetic Transamination Reaction. *Angew Chem. Int Ed.* **45**, 5307–5311.
76. Chan, A. O.-Y., Ho, C.-M., Chong, H.-C., Leung, Y.-C., Huang, J.-S., Wong, M.-K. & Che, C.-M. (2012). Modification of N-terminal  $\alpha$ -amino groups of peptides and proteins using ketenes. *J Am Chem Soc.* **134**, 2589–2598.
-



- 
77. Baker, D. P., Lin, E. Y., Lin, K., Pellegrini, M., Petter, R. C., Chen, L. L., Arduini, R. M., Brickelmaier, M., Wen, D., Hess, D. M., Chen, L., Grant, D., Whitty, A., Gill, A., Linder, D. J. & Pepinsky, R. B. (2006). N-Terminally PEGylated Human Interferon-beta-1a with Improved Pharmacokinetic Properties and in Vivo Efficacy in a Melanoma Angiogenesis Model. *Bioconjug Chem.* **17**, 179-188.
78. Kim, Y., Ho, S. O., Gassman, N. R., Korlann, Y., Landorf, E. V., Collart, F. R. & Weiss, S. (2008). Efficient site-specific labeling of proteins via cysteines. *Bioconjug Chem.* **19**, 786-791.
79. Hooker, J. M., Kovacs, E. W. & Francis, M. B. (2004). Interior surface modification of bacteriophage MS2. *J Am Chem Soc.* **126**, 3718-3719.
80. Schelté, P., Boeckler, C., Frisch, B. & Schuber, F. (2000). Differential reactivity of maleimide and bromoacetyl functions with thiols: application to the preparation of liposomal diepitope constructs. *Bioconjug Chem.* **11**, 118-123.
81. Vanderhooft, J. L., Mann, B. K. & Prestwich, G. D. (2007). Synthesis and characterization of novel thiol-reactive poly (ethylene glycol) cross-linkers for extracellular-matrix-mimetic biomaterials. *Biomacromolecules* **8**, 2883-2889.
82. Bednar, R. A. (1990). Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to N-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry* **29**, 3684-3690.
83. Yamada, M. D., Nakajima, Y., Maeda, H. & Maruta, S. (2007). Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *J Biochem.* **142**, 691-698.
84. Shishido, H., Yamada, M. D., Kondo, K. & Maruta, S. (2009). Photocontrol of calmodulin interaction with target peptides using azobenzene derivative. *J Biochem.* **146**, 581-590.
85. Numano, R., Szobota, S., Lau, A. Y., Gorostiza, P., Volgraf, M., Roux, B., Trauner, D. & Isacoff, E. Y. (2009). Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 6814-6819.
86. Lester, H. A., Nass, M. M., Krouse, M. E., Nerbonne, J. M., Wassermann, N. H. & Erlanger, B. F. (1980). Electrophysiological Experiments With Photoisomerizable Cholinergic Compounds: Review and Progress Report\*. *Ann N Y Acad Sci*, **346**, 475-490.
87. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R. H. (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci.* **7**, 1381-1386.
88. Schierling, B., Noël, A.-J., Wende, W., Hien, L. T., Volkov, E., Kubareva, E., Oretskaya, T., Kokkinidis, M., Römpf, A., Spengler, B. & Pingoud, A. (2010). Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**, 1361-1366.
89. Kumita, J. R., Smart, O. S. & Woolley, G. A. (2000). Photo-control of helix content in a short peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**, 3803-3808.
90. Flint, D. G., Kumita, J. R., Smart, O. S. & Woolley, G. A. (2002). Using an Azobenzene Cross-Linker to Either Increase or Decrease Peptide Helix Content upon Trans-to-Cis Photoisomerization. *Chem Biol.* **9**, 391-397.
-

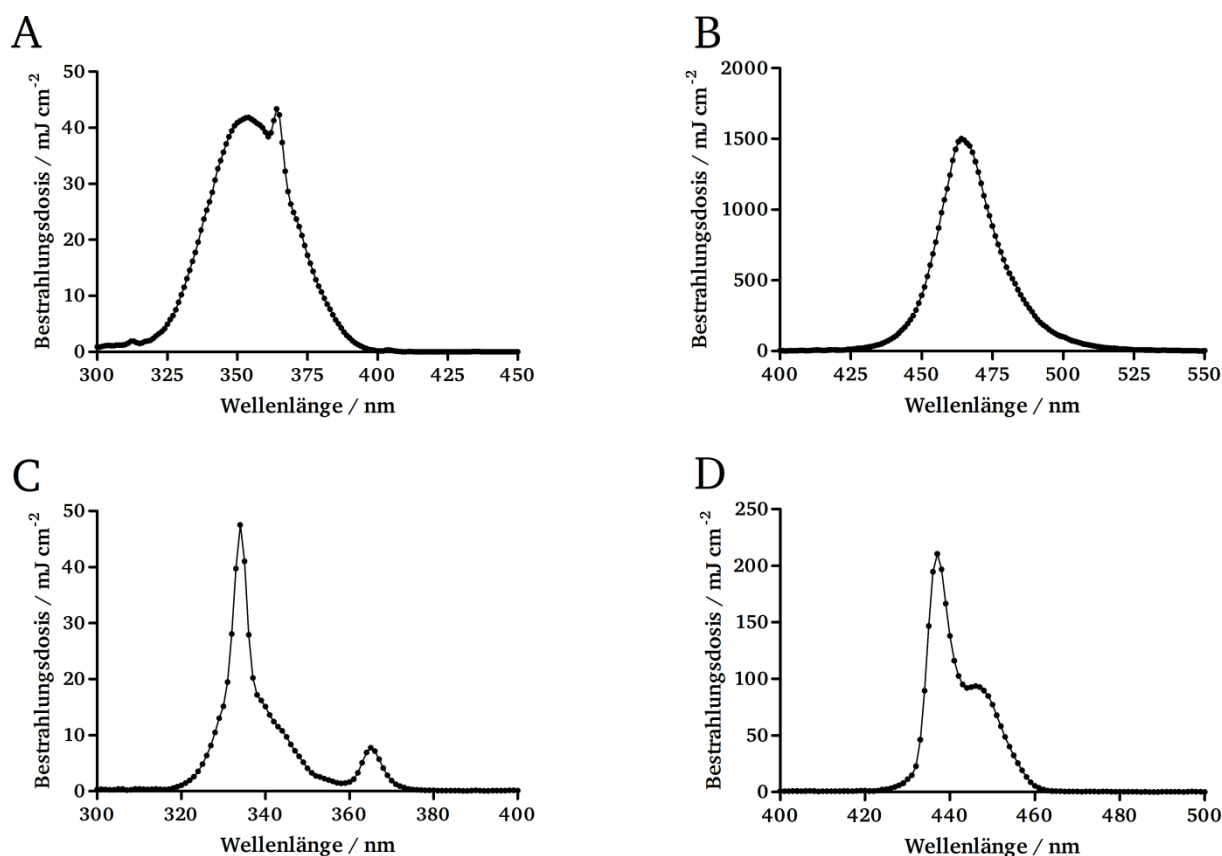
- 
91. **Borisenko, V. & Woolley, G. A. (2005).** Reversibility of conformational switching in light-sensitive peptides. *J Photochem Photobiol A Chem.* **173**, 21–28.
  92. **Pozhidaeva, N., Cormier, M.-E., Chaudhari, A. & Woolley, G. A. (2004).** Reversible photocontrol of peptide helix content: adjusting thermal stability of the cis state. *Bioconj Chem.* **15**, 1297–1303.
  93. **Dong, S.-L., Löweneck, M., Schrader, T. E., Schreier, W. J., Zinth, W., Moroder, L. & Renner, C. (2006).** A Photocontrolled beta-Hairpin Peptide. *Chemistry.* **12**, 1114–1120.
  94. **Hohsaka, T., Kajihara, D., Ashizuka, Y., Murakami, H. & Sisido, M. (1999).** Efficient incorporation of nonnatural amino acids with large aromatic groups into streptavidin in in vitro protein synthesizing systems. *J Am Chem Soc.* **121**, 34–40.
  95. **Nakayama, K., Endo, M. & Majima, T. (2004).** Photochemical regulation of the activity of an endonuclease BamHI using an azobenzene moiety incorporated site-selectively into the dimer interface. *Chem. Commun.*, 2386–2387.
  96. **Bose, M., Groff, D., Xie, J., Brustad, E. & Schultz, P. G. (2006).** The Incorporation of a Photoisomerizable Amino Acid into Proteins in *E. coli*. *J Am Chem Soc.* **128**, 388–389.
  97. **Hildmann, C., Ninkovic, M., Dietrich, R., Wegener, D., Riester, D., Zimmermann, T., Birch, O. M., Bernegger, C., Loidl, P. & Schwienhorst, A. (2004).** A new amidohydrolase from *Bordetella* or *Alcaligenes* strain FB188 with similarities to histone deacetylases. *J Bacteriol.* **186**, 2328–2339.
  98. **De Ruijter, A., Van Gennip, A., Caron, H., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. (2003).** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749.
  99. **Nielsen, T. K., Hildmann, C., Dickmanns, A., Schwienhorst, A. & Ficner, R. (2005).** Crystal structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue. *J Mol Biol.* **354**, 107–120.
  100. **Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P. & Christianson, D. W. (2011).** Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr opin Struct Biol.* **21**, 735–743.
  101. **Schäfer, S., Saunders, L., Eliseeva, E., Velen, A., Jung, M., Schwienhorst, A., Strasser, A., Dickmanns, A., Ficner, R., Schlimme, S., Sippl, W., Verdin, E. & Jung, M. (2008).** Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs). *Bioorg Med Chem.* **16**, 2011–2033.
  102. **Hildmann, C., Riester, D. & Schwienhorst, A. (2007).** Histone deacetylases—an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol.* **75**, 487–497.
  103. **Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M. C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Carfi, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkühler, C. & Gallinari, P. (2007).** Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**, 17335–17340.
  104. **Leipe, D. D. & Landsman, D. (1997).** Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolymine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic acids Res.* **25**, 3693–3697.
-

105. **Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. (2009).** The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* **10**, 32–42.
106. **Delcuve, G. P., Khan, D. H. & Davie, J. R. (2012).** Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* **4**:5.
107. **Li, G., Jiang, H., Chang, M., Xie, H. & Hu, L. (2011).** HDAC6  $\alpha$ -tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci.* **304**, 1–8.
108. **Wegener, D., Hildmann, C., Riester, D. & Schwienhorst, A. (2003).** Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications. *Anal Biochem.* **321**, 202–208.
109. **Wegener, D., Wirsching, F., Riester, D. & Schwienhorst, A. (2003).** A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem Biol.* **10**, 61–68.
110. **Hildmann, C. (2004).** Funktionelle Charakterisierung bakterieller Histondeacetylase-ähnlicher Amidohydrolasen (HDAH), Dissertation, Fakultät für Biologie und Psychologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
111. **Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. & Liang, J. (2006).** CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic acids Res.* **34**, W116–W118.
112. **Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* **25**, 1605–1612.
113. **Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996).** VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33–38.
114. **Krieger, E. & Vriend, G. (2002).** Models@ Home: distributed computing in bioinformatics using a screensaver based approach. *Bioinformatics* **18**, 315–318.
115. **Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S. B., Finkelstein, A. & Vriend, G. (2004).** Making optimal use of empirical energy functions: Force-field parameterization in crystal space. *Proteins.* **57**, 678–683.
116. **Birnboim, H. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* **7**, 1513–1523.
117. **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**, 5463–5467.
118. **Mullis, F., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R, Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold SpringHarb Symp Quant Biol.* **51**, 263–273.
119. **Maloy, S. R., Stewart, V. J., & Taylor, R. K. (1996).** Genetic analysis of pathogenic bacteria: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)

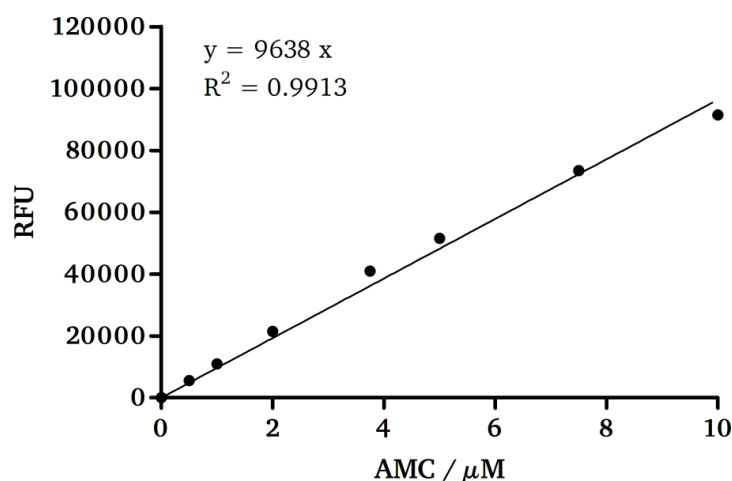
- 
120. Geier, G. E. & Modrich, P. (1979). Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J Biol Chem.* **254**, 1408–1413.
  121. Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* **53**, 159–162.
  122. Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **69**, 2110–2114.
  123. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**, 23–28.
  124. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* **258**, 598–599.
  125. Wiechelman, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* **175**, 231–237.
  126. Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, Md., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. & Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**, 76–85.
  127. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
  128. Towell, J. F. & Manning, M. C. (1994). Analysis of protein structure by circular dichroism spectroscopy. in: Analytical applications of circular dichroism, Purdie, N., Brttn, H. G., Hrsg., Elsevier, Amsterdam, NL.
  129. Kelly, S. M. & Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* **1**, 349–384.
  130. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–2423.
  131. Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J. & Kollman, P. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem.* **24**, 1999–2012.
  132. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys.* **103**, 8577–8593.
  133. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. (1992). SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem.* **13**, 952–962.
  134. Krieger, E., Nielsen, J. E., Spronk, C. A. & Vriend, G. (2006). Fast empirical pKa prediction by Ewald summation. *J Mol Graph Model.* **25**, 481–486.
-

- 
135. Berendsen, H. J., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys.* **81**, 3684.
  136. Balasubramanian, G., Banerjee, S. & Puri, I. K. (2008). Unsteady nanoscale thermal transport across a solid-fluid interface. *J Chem Phys.* **104**, 064306–064306.
  137. Bissantz, C., Kuhn, B. & Stahl, M. (2010). A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *J Med Chem.* **53**, 5061–5084.
  138. Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol.* **55**, 379–400.
  139. Korbus, M., Backé, S. & Meyer-Almes, F.-J. (2015). The cis-state of an azobenzene photoswitch is stabilized through specific interactions with a protein surface. *J Mol Recognit.* **28**, 201-209
  140. Dowling, D. P., Gantt, S. L., Gattis, S. G., Fierke, C. A. & Christianson, D. W. (2008). Structural Studies of Human Histone Deacetylase 8 and Its Site-Specific Variants Complexed with Substrate and Inhibitors. *Biochemistry* **47**, 13554–13563.
  141. Harvey, J. H. & Trauner, D. (2008). Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label. *ChemBioChem* **9**, 191–193.
  142. Füchsel, G., Klamroth, T., Dokic, J. & Saalfrank, P. (2006). On the electronic structure of neutral and ionic azobenzenes and their possible role as surface mounted molecular switches. *J Phys Chem B* **110**, 16337–16345.
  143. Schanze, K. S., Mattox, T. F. & Whitten, D. G. (1983). Solvent effects on the thermal cis-trans isomerization and charge-transfer absorption of 4-(diethylamino)-4'-nitroazobenzene. *J Org Chem.* **48**, 2808–2813.
  144. Edgcomb, S. P. & Murphy, K. P. (2002). Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with burial within proteins. *Proteins.* **49**, 1–6.
  145. Eisenthal, R., Danson, M. J. & Hough, D. W. (2007). Catalytic efficiency and  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ : a useful comparator? *Trends Biotechnol.* **25**, 247–249.

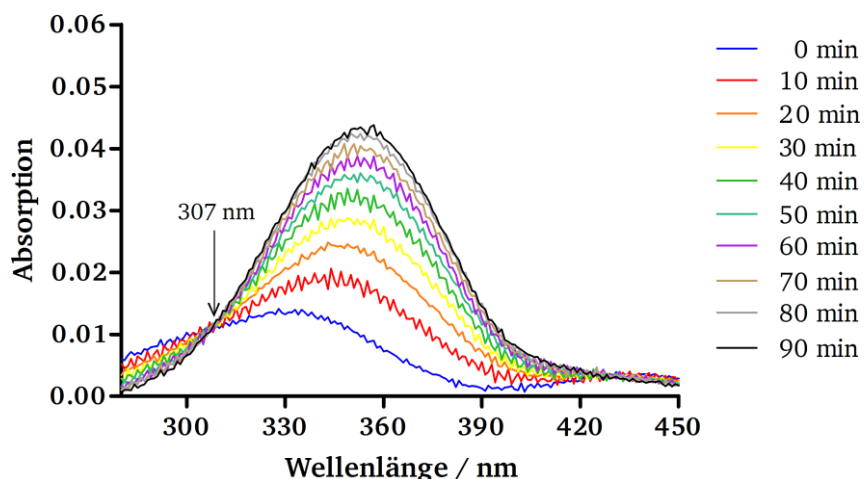
## 8. Anhang



**Abb. A. 1: Applizierte UV-A und Blaulicht Bestrahlungsdosen.** Die in A-D dargestellten Bestrahlungsdosenspektren ( $\text{mJ cm}^{-2}$ ) wurden aus den jeweiligen spektralen Strahldichten ( $\text{W m}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ ) kalkuliert (Kap. 3.2.9). (A) Bestrahlungsdosis der UV-A (6 W, 366 nm, Heraeus) sowie (B) Blaulichthandlampe (1 W, LED, Osram) im Abstand von 6 cm zur Probenoberfläche bei einer Bestrahlungszeit von 25 min. (C) Bestrahlungsdosis durch Weißlicht (400 - 700 nm) mit einem zwischengeschalteten  $450 \pm 10 \text{ nm}$  Bandpassfilter sowie (D) UV-A Licht (320 - 400 nm) mit einem Bandpassfilter von  $340 \pm 10 \text{ nm}$  durch Verwendung der Quecksilberdampf-Hochdrucklampe (200 W, *Superlite* SUV-DC-E, Lumatec). Die Distanz von dem Flüssiglichtleiter zur Probenoberfläche betrug jeweils 3 cm (C und D) sowie die Bestrahlungszeit 1 min (C) und 2 min (D). Die über das entsprechende Wellenlängenspektrum integrierten Gesamtbestrahlungsdosen wurden in Kap. 3.2.9 angegeben.

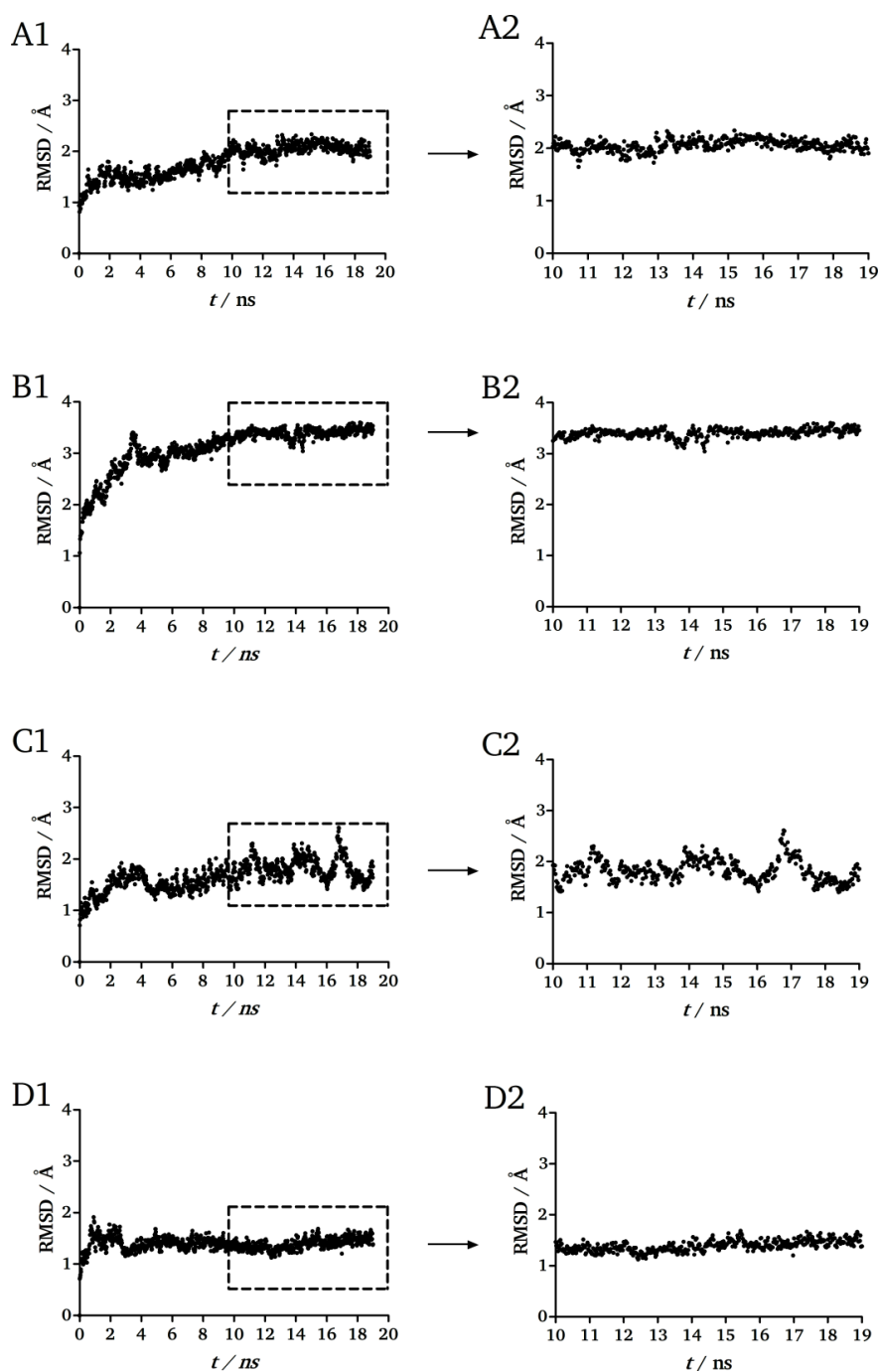


**Abb. A. 2: AMC-Kalibriergerade.** AMC wurde in MKA-Puffer auf verschiedene Konzentrationen (0.5, 1, 2, 3.75, 5, 7.5 und 10  $\mu\text{M}$ ) verdünnt und jene als Triplikate, zu je 100  $\mu\text{l}$ , in eine schwarze 96-Well *half-area* Mikrotiterplatte (*flat bottom, polystyrene, medium-binding*, Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert. Die RFU wurde mit dem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader (PHERAstar Plus, BMG Labtech) zum Zeitpunkt  $t = 0$  detektiert. Von den RFU-Werten wurde das durch den MKA-Puffer erzeugte Hintergrundsignal subtrahiert und diese gegen die eingesetzte AMC-Konzentration aufgetragen (schwarze Datenpunkte). Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Die ermittelte Steigung der Regressionsgeraden wurde für die Berechnung des Michelis-Menten Parameters  $V_{\text{max}}$  ( $\text{nM s}^{-1}$ ) verwendet (Kap. 3.2.13.2). Hierzu wurde jeweils die gemessene HDAH-Aktivität ( $\text{RFU s}^{-1}$ ) durch 9.638 ( $\text{RFU nM}^{-1}$ ) dividiert.



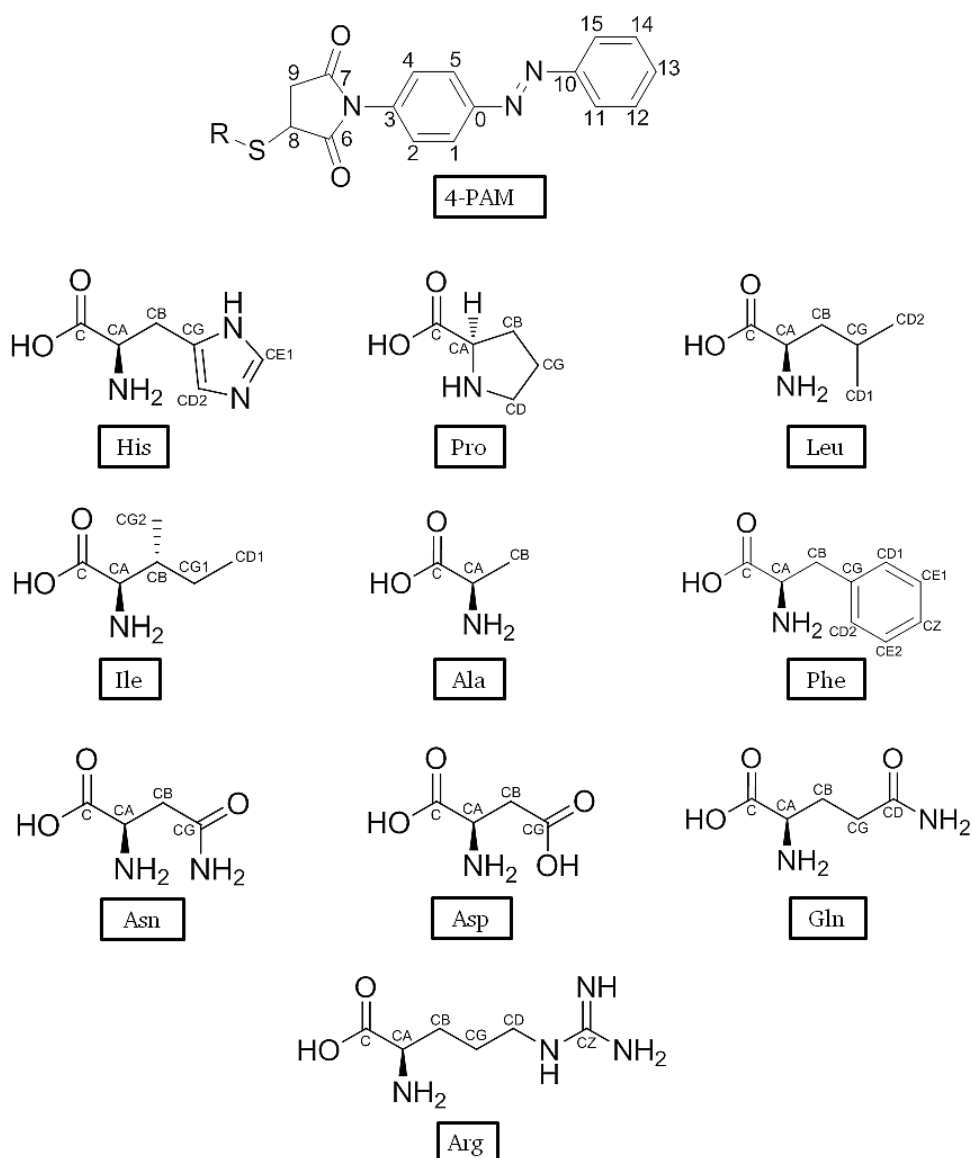
**Abb. A. 3: Isosbestischer Punkt von 4-PAM.** 8  $\mu\text{M}$  4-PAM wurden in MK-Puffer mit UV-A Licht bestrahlt (Kap. 3.2.8.1) und die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation UV/Vis-spektroskopisch aufgenommen (Kap. 3.2.15.1). Dargestellt sind UV/Vis-Spektren in einem 10 minütigen Zeitintervall bis 90 min. Der isosbestische Punkt bei 307 nm, welcher für die Normierung aller thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxationskinetiken verwendet wurde, ist mit einem Pfeil angedeutet.





**Abb. A. 4: RMSD-Werte von 4-PAM/HDAH-S20C und M30C.** Zur Analyse von Atom-Trajektorien in einem ausreichend energieminierten und stabilen Proteinmolekülzustand wurden in Abhängigkeit der Simulationszeit die RMSD-Werte auf Basis des Proteinrückgrads (C-C<sub>α</sub>-Atome) berechnet. Die Kalkulation erfolgte mit dem Programm VMD über 950 Simulationsbilder mit entsprechenden Trajektorien (zu je 20 ps Schritten; 0 - 19 ns). Als Referenzstruktur diente die jeweilige Proteinmolekülstruktur der HDAH-Varianten zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Die kalkultierten RMSD-Werte wurden über die gesamte Messzeit (0 - 19 ns; 1) sowie über den zur Analyse verwendeten Zeitraum (10 - 19 ns; 2) dargestellt. *cis*- (A) und *trans*- (B) 4-PAM/HDAH-S20C, *cis*- (C) und *trans*- (D) 4-PAM/HDAH-M30C. Der RMSD-Mittelwert  $\pm$  SD wurde im Zeitraum von 10 - 19 ns ermittelt.

Für *cis*-4-PAM/HDAH-S20C (Abb. A. 4, A2) konnte ein RMSD-Wert von  $2.1 \pm 0.1$  Å und für *trans*-4-PAM/HDAH-S20C (Abb. A. 4, B2) ein RMSD-Wert von  $3.4 \pm 0.1$  Å berechnet werden. Für *cis*-4-PAM/HDAH-M30C (Abb. A. 4, C2) wurde ein RMSD-Wert von  $1.8 \pm 0.2$  Å und für *trans*-4-PAM/HDAH-M30C (Abb. A. 4, D2) ein RMSD-Wert von  $1.4 \pm 0.1$  Å kalkuliert.

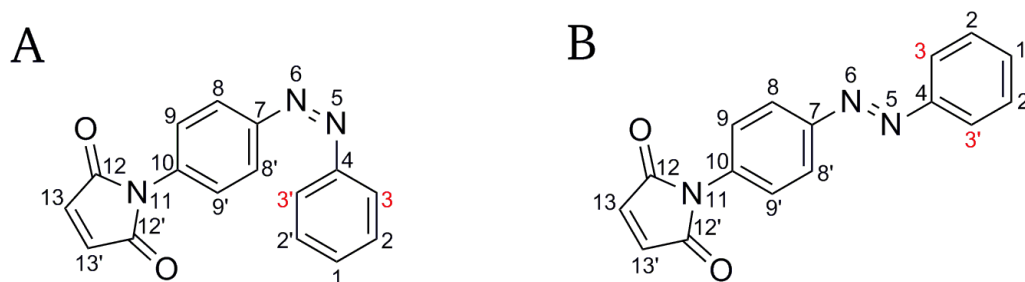


**Abb. A. 5: VMD spezifische Annotation der C-Atome von 4-PAM und von den wichtigsten Aminosäuren.**

Zum Verständnis der prognostizierten C-C Interaktionen zwischen dem an HDAH-S20C oder M30C gekoppelten 4-PAM-Rest und HDAH selbst, wurden die C-Atome der wichtigsten Aminosäuren ( $\geq 3$  Interaktionen) nach VMD-Spezifikation aufgelistet. Die Aminosäuren wurden nach dem drei-Buchstabencode benannt. „R“ bezeichnet den HDAH-Cysteinrest, an den 4-PAM kovalent modifiziert wurde. Die C-Atome von 4-PAM wurden mit Zahlen spezifiziert, während die Zuordnung der C-Atome von Aminosäuren nach griechischen Symbolen erfolgte: CA = C $\alpha$ , CB = C $\beta$ , CG = C $\gamma$ , CD = C $\delta$ , CE = C $\epsilon$ , CZ = C $\zeta$ .

**Tab. A. 1: Prognostizierte Peptidfragmente von HDAH-Wt nach tryptischen Verdau.** Der tryptische Verdau wurde mit dem ExPASy-Server basierten Programm „*PeptideCutter*“ simuliert. Die in Dalton angegebenen Peptidmassen stellen Massen mit durchschnittlicher Isotopenverteilung dar. Cystein enthaltende Peptidfragmente sind grün eingrahmt und Cysteine in rot markiert. Der N-terminal gelegene His<sub>6</sub>-Tag wurde nicht berücksichtigt.

Fragment	Spaltungsposition	Peptidsequenz (vom N-Terminus beginnend)	Peptidlänge	Peptidmasse / Da
1	29	MAIGYVWNTLYGWVDTGTGSLAAANLTAR	29	3073.5
2	43	MQPISHHLAHPDTK	14	1611.8
3	44	R	1	174.2
4	45	R	1	174.2
5	74	FHELVC <sub>51</sub> ASGQIEHLTPIAAVAATDADILR	29	3062.5
6	85	AHSAAHLENMK	11	1208.4
7	86	R	1	174.2
8	112	VSNLPTGGDTGDGITMMGNGGLEIAR	26	2533.8
9	123	LSAGGAVELTR	11	1073.2
10	124	R	1	174.2
11	166	VATGELSAGYALVNPPGHHAPHNAAMGFC <sub>153</sub> IFNNTSVAAGYAR	42	4255.8
12	173	AVLGMER	7	774.9
13	218	VAILDWDVHHGNGTQDIWWNDPSVLTISLHQH LC <sub>207</sub> FPPDSGYSTER	45	5158.7
14	254	GAGNGHGYNINVPLPPGSGNAAYLHAMDQVVL HALR	36	3682.1
15	277	AYRPQLIIVGSGFDASMLDPLAR	23	2490.9
16	286	MMVTADGFR	9	1027.2
17	290	QMAR	4	504.6
18	291	R	1	174.2
19	303	TIDC <sub>295</sub> AADIC <sub>300</sub> DGR	12	1252.4
20	332	IVFVQEGGYSPHYLPFC <sub>320</sub> GLAVIEELTGVR	29	3194.7
21	355	SLPDYHEFLAGMGNTLLDAER	23	2503.8
22	369	AAIEEIVPLLADIR	14	1522.8



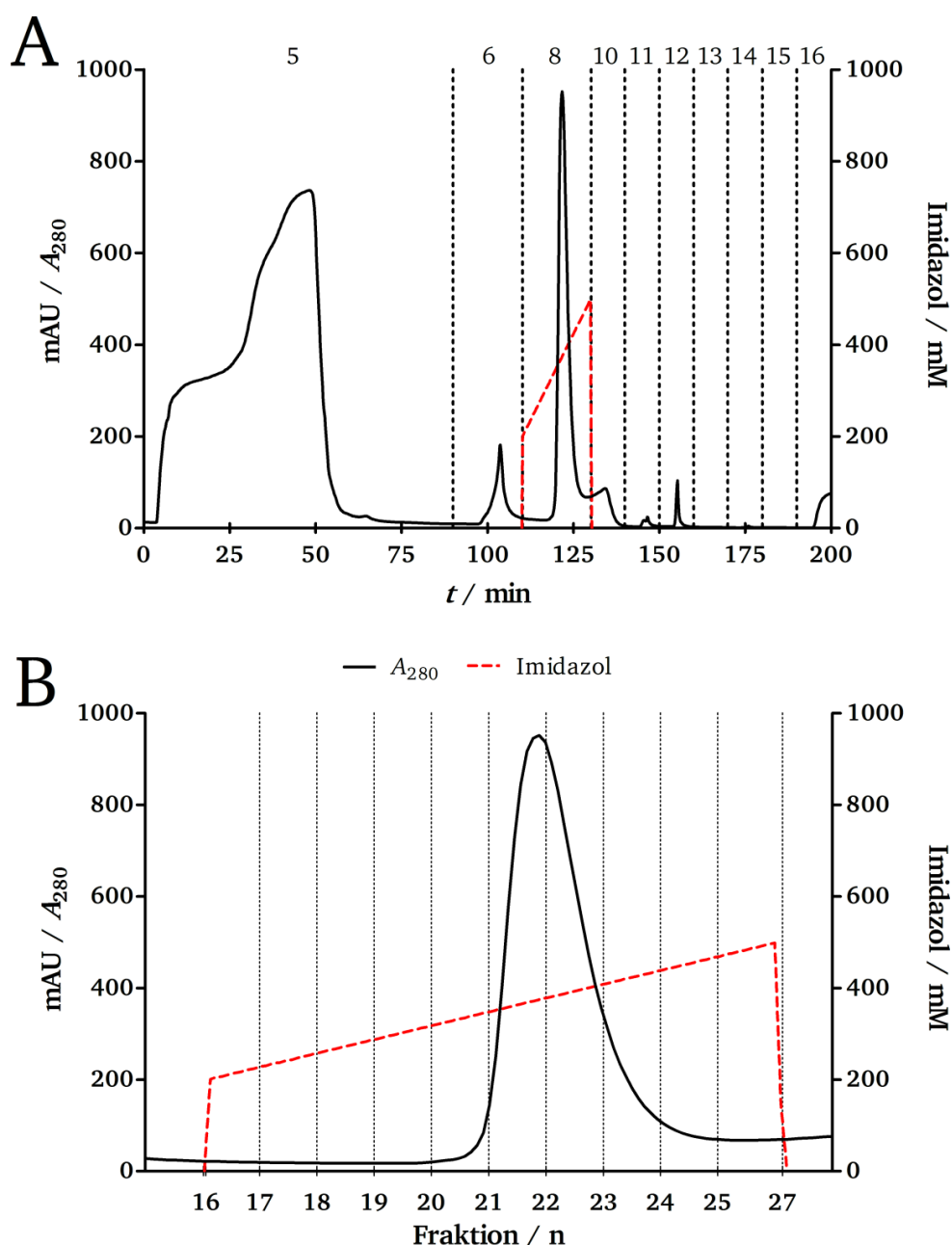
**Abb. A. 6: Protonenannotation der 4-PAM-Isomere.** (A) *cis*-4-PAM, (B) *trans*-4-PAM. Die Protonen H<sub>8</sub> und H<sub>9</sub> konnten nicht eindeutig zugewiesen werden. Bezugnehmend auf die detektierte chemische Verschiebung (Tab. A. 1), wurde die Zuordnung der aromatischen Protonen wie dargestellt vorgenommen.

**Tab. A. 2: Zuordnung und chemische Verschiebung von *cis*- und *trans*-4-PAM in DMSO-d<sub>6</sub>.**

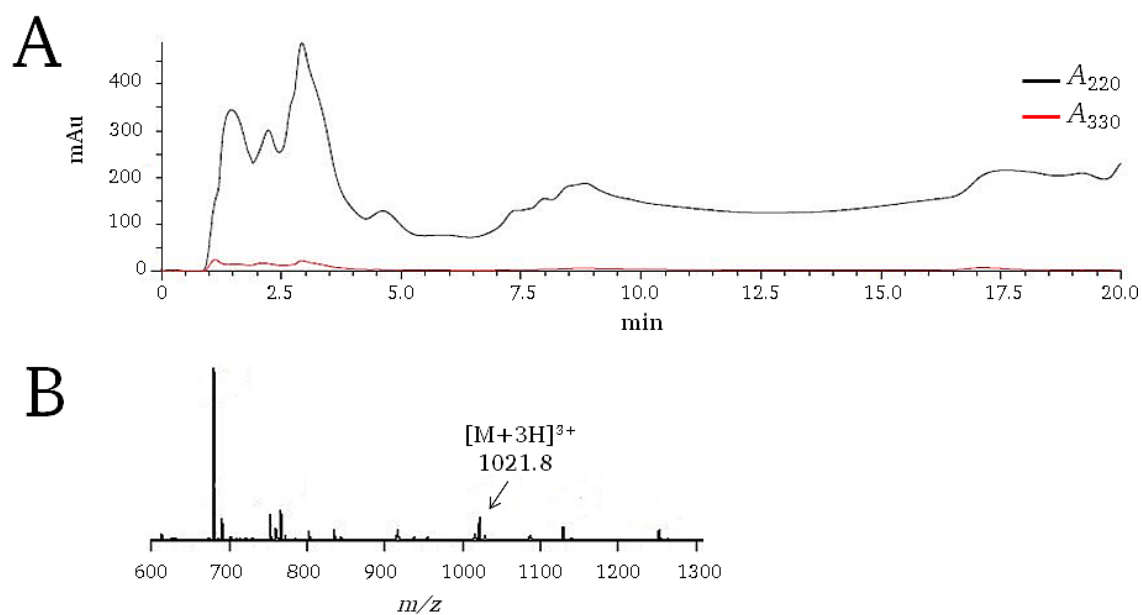
<sup>1</sup> H chem. Verschiebung <i>cis</i> -4-PAM (ppm)	Atomnummerierung	<sup>1</sup> H chem. Verschiebung <i>trans</i> -4-PAM (ppm)	<sup>13</sup> C chem. Verschiebung <i>trans</i> -4-PAM (ppm)
7.19	1	7.63 - 7.59 (m)*	131.7
7.33	2	7.63 - 7.59 (m)*	129.5
6.87	3	7.92	122.6
-	4	-	151.9
-	7	-	150.5
7.28	8 <sup>#</sup>	8.01	122.9
6.95	9 <sup>#</sup>	7.63 - 7.59 (m)*	127.2
-	10	-	134.2
-	12	-	169.6
7.12	13	7.23	134.9

\* = Das Multipllett bei 7.63 - 7.59 ppm besitzt ein Integral von ca. 5 und beinhaltet die Signale der zugeordneten Protonen an Position 1, 2 und 9.

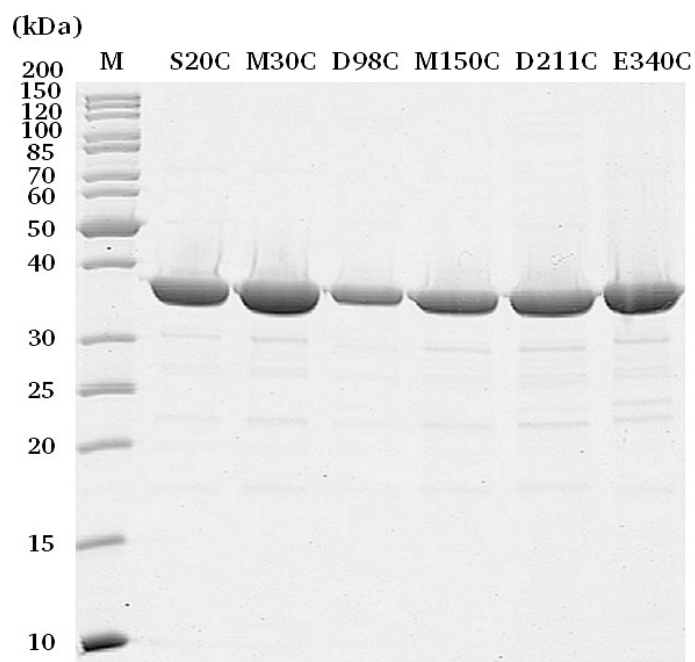
<sup>#</sup> = Eine Zuordnung der aromatischen Positionen 8 und 9 konnte nicht eindeutige durchgeführt werden. Die dargestellte Zuordnung wurde aus Basis von Tendenzen der chemischen Verschiebung vorgenommen.



**Abb. A. 7: IMAC-Chromatogramm von HDAH-Variante H35S an immobilisierten  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen.** Dargestellt ist der generelle zeitliche Verlauf einer durchgeführten IMAC, ab der Probeninjektion (A) und im Detail (B) durch kompetitive Elution von  $\text{His}_6$ -Tag gebundenen Proteinen mittels einem linearen Imidazolgradienten (200 - 500 mM; rote gestrichelte Linie). Die Detektion von Proteinen erfolgte in Milliabsorptionseinheiten (mAU) bei  $A_{280}$ . Die in A aufgeführten Zahlen 5 - 16 stellen die Programmschritte des verwendeten IMAC-Programms (Tab. 8) und die vertikal eingezogenen gestrichelten Linien markieren den jeweiligen Zeitabschnitt. Die während des Imidazolgradienten eluierten Proteinfractionen wurden zu je 2 ml gesammelt (B). Alle mittels IMAC aufgereinigten HDAH-Varianten zeigten ähnliche Chromatogramme und Reinheiten auf.

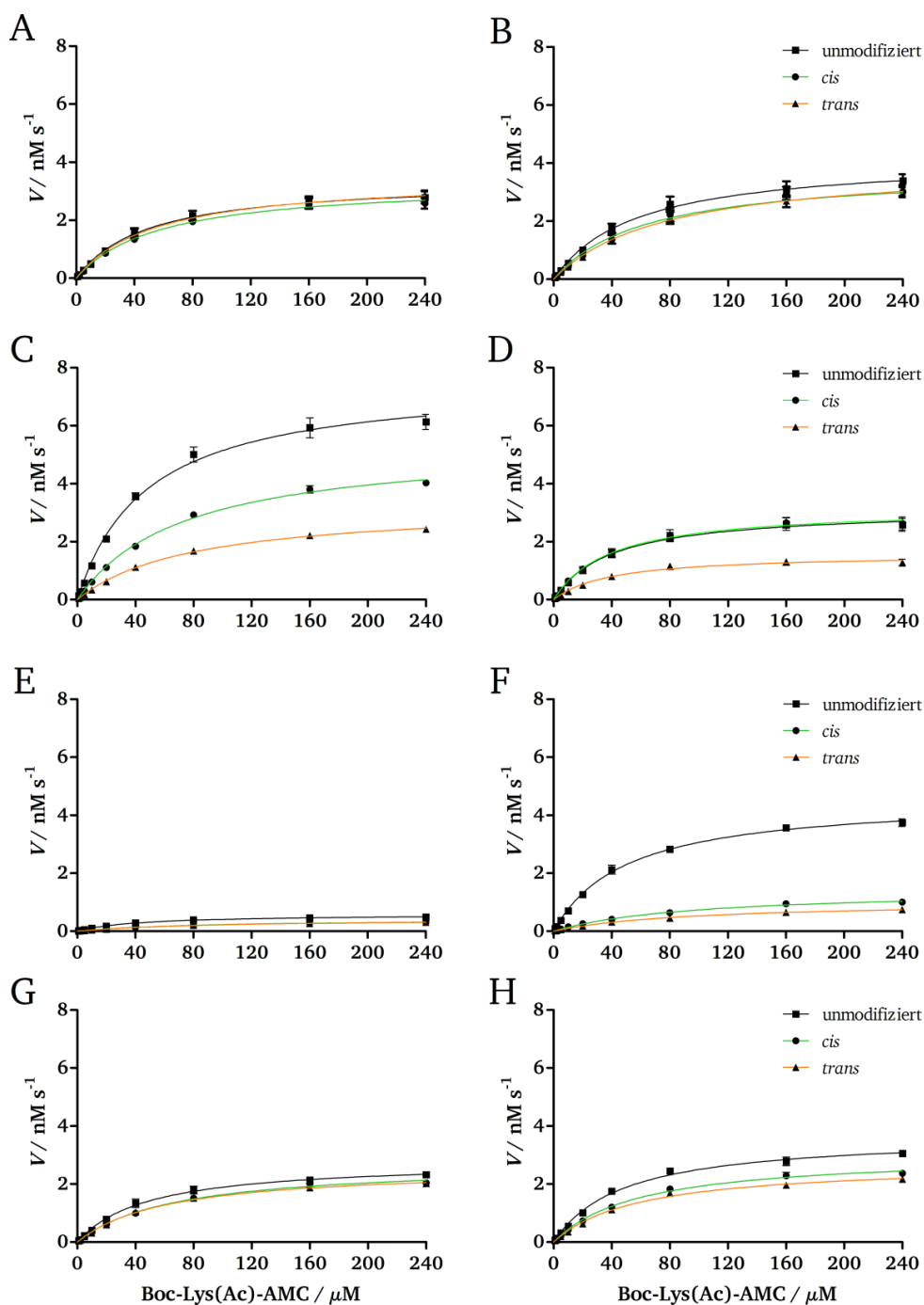


**Abb. A. 8: LC-ESI-MS Analyse von Trypsin-hydrolysierten HDAH-Wt-Konjugat.** (A) LC-Chromatogramm. Die allgemeine Detektion von Peptidfragmenten erfolgte durch Absorptionsmessung bei 220 nm (schwarze Linie) sowie die von 4-PAM-modifizierten Peptidfragmenten bei 330 nm (rote Linie). (B) Massenspektrum 4.133 - 5.250 min. Die wichtigsten  $m/z$ -Verhältnisse wurden durch Angabe der entsprechenden Protonierung gekennzeichnet. Die 4-PAM Modifikation von HDAH, der tryptische Verdau und die Durchführung der LC-ESI-MS Messung erfolgte wie in Kap. 3.2.17 beschrieben. mAu = Milliabsorptionseinheiten. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>



**Abb. A. 9: SDS-PAGE verschiedener exprimierter Cystein-HDAH-Varianten.** Zur Abschätzung der Probenreinheit wurde eine SDS-PAGE Analyse von verschiedenen exprimierten Cystein-HDAH-Varianten (S20C, M30C, D98C, M150C, D211C und E340C, Abb. 22 A) durchgeführt. Die SDS-PAGE (Kap. 3.2.7) erfolgte in einem 12.5 % PA-Gel. Die HDAH-Konzentrate wurden insgesamt 1:10 verdünnt. Die Reinheit der Proben konnte verallgemeinert mittels dem Programm ImageJ auf  $\geq 95$  % abgeschätzt werden. Als Bezugspunkt diente die Gelspur von HDAH-E340C.





**Abb. A. 10: Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten.** HDAH-Wt (A), C51S (B), S20C (C), M30C (D), D98C (E), M150C (F), D211C (G) und E340C (H) wurden mit 4-PAM modifiziert, die 4-PAM/HDAH-Konjugate mit UV-A (*cis*-Konfiguration) oder Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt und Michaelis-Menten Kinetiken (Kap. 3.2.13.2) aufgenommen. Die Michaelis-Menten Kinetiken der jeweils unmodifizierten HDAH-Varianten sind als schwarze Kurven dargestellt. Die Auswertung der Michaelis-Menten Kinetiken ( $V_{\max}$  und  $K_m$ ) erfolgte mittels GraphPad Prism. Hierzu wurde die Substratumsatzgeschwindigkeit  $V$  ( $\text{nM s}^{-1}$ ) gegen die entsprechende Substratkonzentration (Boc-Lys(Ac)-AMC) aufgetragen. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Tab. A. 3: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 Å) zwischen *cis*-4-PAM und Aminosäuren von HDAH-M30C. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>16</sup>

Aminosäuren	Involvierte C-Atome von Aminosäuren	Involvierte C-Atome von <i>cis</i> -4-PAM	Gemittelte Interaktionswahrscheinlichkeit / %
Asn 25 (1)	CA	C13	60.0
	CA	C14	8.7
	CB	C2	91.3
	CG	C2	26.0
	CG	C11	14.0
	CG	C12	22.7
	C	C6	1.3
Ala 23 (2)	C	C14	42.0
	C	C4	6.7
	CB	C14	58.0
	CA	C14	7.3
	CA	C4	3.3
Ala 24 (3)	C	C13	12.7
	C	C14	21.3
	CA	C14	13.3
	CA	C6	14.0
Asp 95 (4)	CG	C15	10.7
	CB	C15	18.0
	CA	C10	1.3
Ala 28 (5)	CB	C8	4.8
	CB	C2	20.7
Leu 21 (6)	CB	C5	8.0
	CD	C5	8.7
Gly 99 (7)	CA	C10	8.7
	C	C10	2.0
	C	C15	3.7
Met 102 (8)	CE	C14	10.7
Ala 22 (9)	CB	C14	8.0
Gly 94 (10)	CA	C11	4.0
	C	C10	2.7

Tab. A. 4: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 und 3.8 Å) zwischen *cis*-4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C. Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

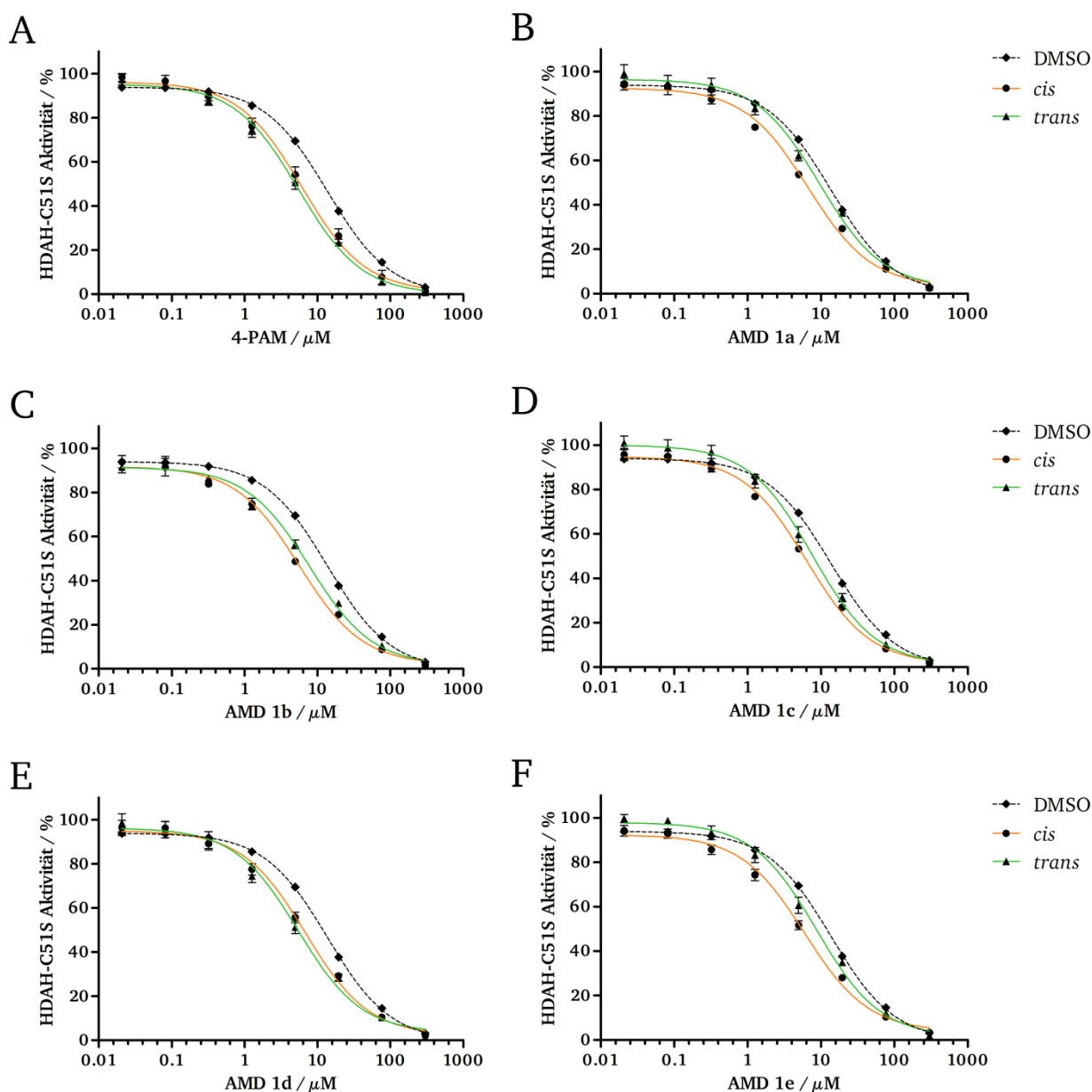
Aminosäuren	Involvierte C-Atome von Aminosäuren	Involvierte C-Atome von <i>cis</i> -4-PAM	Gemittelte Interaktions- wahrscheinlichkeit / %	
			Distanz (4.4 Å)	Distanz (3.8 Å)
His 35 (1)	CB	C14	28.7	5.3
	CB	C13	9.3	1.3
	CG	C14	53.3	29.3
	CD2	C14	39.3	20.0
	CD2	C13	4.7	-
	CE1	C14	40.0	24.0
	CE1	C15	-	2.7
Pro 274 (2)	CA	C1	9.3	-
	CA	C12	4.7	-
	CB	C11	46.0	-
	CB	C1	20.0	-
	CG	C12	31.3	-
	C	C1	22.0	-
Leu 37 (3)	CD2	C11	6.0	-
	CD2	C12	12.7	-
	CD2	C14	2.4	-
	CD1	C2	14.7	-
	CD1	C6	29.3	-
	CD1	C8	12.0	-
	CG	C6	11.3	-
Leu 275 (4)	CD1	C2	12.0	-
	CD1	C7	4.7	-
	CD2	C7	32.0	-
	CD2	C2	10.0	-
	CG	C2	14.0	-
Ile 33 (5)	CD1	C6	20.7	-
	CD1	C4	18.0	-
	CG2	C6	2.0	-
Leu 21 (6)	CG	C8	4.0	-
	CD2	C8	2.7	-
	CD1	C8	6.0	-
Gln 31 (7)	CD	C9	9.3	-

Tab. A. 5: MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (3.8 Å) zwischen *trans*-4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C. Modifiziert nach Modifiziert nach Korbus *et al.*<sup>139</sup>

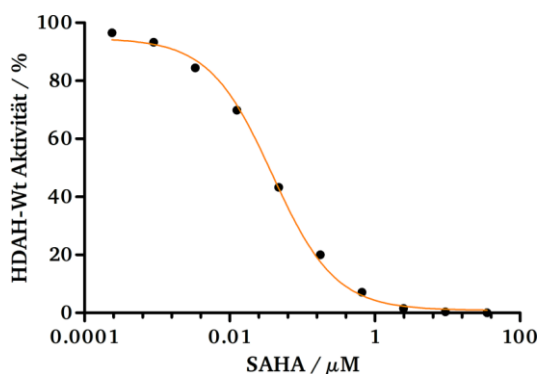
Aminosäuren	Involvierte C-Atome von Aminosäuren	Involvierte C-Atome von <i>trans</i> -4-PAM	Gemittelte Interaktionswahrscheinlichkeit / %
Gln 31 (1)	CD	C2	26.7
	CG	C6	2.7
	CB	C6	7.3
	CG	C2	39.3
	CD	C1	3.3
Phe 208 (2)	CZ	C	14.0
	CE1	C	22.0
	CE2	C11	5.3
	CZ	C11	4.0
	CE1	C5	10.0
	CZ	C5	5.3
	CE2	C15	1.3
Arg 29 (3)	C	C5	21.3
	CB	C15	2.0
	CG	C14	2.7
	CD	C14	17.3
	CZ	C13	2.7
	CG	C11	6.7
	CB	C10	3.3
Leu 275 (4)	CD2	C7	38.7
	CD2	C4	3.3
	CD1	C4	4.7
	CD1	C9	4.7
Pro 209 (5)	CB	C11	12.7
	CG	C5	8.0
	CD	C5	4.7
	CB	C15	3.3
Met 30 (6)	CA	C5	4.0
	CA	C4	2.0

Zur Bestimmung von intermolekularen C-C Kontakten zwischen kovalent angekoppelten *cis*-4-PAM und dem Proteinrückgrad (C-C<sub>α</sub>) sowie Aminosäuren von HDAH-M30C (Tab. A. 3) und S20C (Tab. A. 4) wurden, basierend auf den erhobenen MD-Simulationsdaten, Interaktionswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit einer definierten Distanz berechnet. Zur Analyse von aliphatischen C-C Kontakten wurde eine Distanz von 4.4 Å gewählt. Potentielle  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen in „*edge to face*“ Orientierung wurden mit einer Distanz von 3.8 Å analysiert.<sup>137</sup> Da *trans*-4-PAM sehr nahe an der Proteinoberfläche von

HDAH-S20C orientiert ist und demzufolge relativ viele unspezifische C-C Kontakte mit 4.4 Å detektiert wurden, wurde die Stringenz der Analyse erhöht und die C-C Kontakte mit einer Distanz von 3.8 Å ausgewertet (Tab. A. 5). Die verifizierten C-C Kontakte wurden über eine Simulationszeit von 10 - 19 ns gemittelt (150 Simulationsbilder) und die Interaktionswahrscheinlichkeit prozentual dargestellt. Die MD-Simulation sowie die Analyse im Detail erfolgten wie beschrieben in Kap. 3.2.16.



**Abb. A. 11: Dosis-Wirkungskurven von 4-PAM und AMDs.** Das inhibitorische Potential der *cis*- und *trans*-Konfiguration von 4-PAM (A) sowie von AMDs **1a-e** (B-F) wurde anhand der HDAH-C51S Aktivität getestet. Die Dosis-Wirkungskurven wurden wie in Kap. 3.2.13.4 beschrieben durchgeführt und die prozentual normierte HDAH-C51S Aktivität gegen die logarithmierte Konzentration der jeweiligen Testsubstanz aufgetragen. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden mit einem Dreiparameter-Modell (GraphPad Prism) ermittelt. Als Negativkontrolle und damit maßgebend zur Einordnung des realen inhibitorischen Effekts wurde zusätzlich die Dosis-Wirkungskurve von DMSO aufgetragen, welche dem jeweiligen DMSO-Anteil innerhalb der seriellen Verdünnungsreihe entsprach. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>



**Abb. A. 12: Dosis-Wirkungskurve von SAHA.** Das inhibitorische Potential von SAHA wurde anhand der HDAH-Wt-Aktivität getestet. Die Dosis-Wirkungskurve wurde wie in Kap. 3.2.13.4 beschrieben durchgeführt und die prozentual normierte HDAH-Wt-Aktivität gegen die logarithmierte Konzentration von SAHA aufgetragen. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (38 nM) wurde mit einem Dreiparameter-Modell (GraphPad Prism) ermittelt. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen einer Einfachbestimmung. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

**Tab. A. 6:  $V_{\text{max}}$  und  $K_{\text{m}}$ -Werte unmodifizierter und AMD-modifizierter HDAH-M30C.** Das AMD 1a-e/HDAH-M30C-Konjugate wurden mit UV-A (*cis*-Konfiguration) oder Blaulicht (*trans*-Konfiguration) bestrahlt und Michaelis-Menten Kinetiken aufgenommen (Kap. 3.2.13.2). Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$  angegeben und einer statistischen Analyse unterzogen (Einfach-ANOVA und Bonferroni post-hoc Test). <sup>a</sup> $P < 0.05$  (*cis*-AMD vs. *trans*-AMD), <sup>b</sup> $P < 0.05$  (unmodifiziert vs. *cis*-AMD), <sup>c</sup> $P < 0.05$  (unmodifiziert vs. *trans*-AMD). \* =  $V_{\text{max}}$  photoschaltbares AMD/HDAH-M30C-Konjugat. ~ =  $K_{\text{m}}$  photoschaltbares AMD/HDAH-M30C-Konjugat. Allgemeine Definition von signifikant photoschaltbaren AMD/HDAH-Konjugaten, siehe Kap. 3.2.13.3. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup> Die im Vergleich zu Tab. 14 höher gemessenen  $V_{\text{max}}$ -Werte von unmodifizierter HDAH-M30C sind auf das verwendete reinere BSA von Sigma, anstelle von Serva oder AppliChem, zurückzuführen.

AMD/HDAH-Konjugate	$V_{\text{max}} / (\text{nM s}^{-1})$		$K_{\text{m}} / \mu\text{M}$			
	unmodifiziert	4-PAM modifiziert				
		<i>cis</i>	<i>trans</i>		<i>cis</i>	<i>trans</i>
1a/M30C *~	6.52 $\pm$ 0.04	2.32 $\pm$ 0.03 <sup>a,b</sup>	3.54 $\pm$ 0.04 <sup>a,c</sup>	33.7 $\pm$ 1.2	42.6 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	61.3 $\pm$ 2.3 <sup>a,c</sup>
1b/M30C *~	5.81 $\pm$ 0.27	3.47 $\pm$ 0.02 <sup>a,b</sup>	1.61 $\pm$ 0.09 <sup>a,c</sup>	56.3 $\pm$ 4.0	48.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	89.9 $\pm$ 2.6 <sup>a,c</sup>
1c/M30C ~	7.03 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	30.9 $\pm$ 1.5	75.2 $\pm$ 9.1 <sup>a,b</sup>	109.6 $\pm$ 6.9 <sup>a,c</sup>
1d/M30C	5.83 $\pm$ 0.20	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.28 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	65.0 $\pm$ 2.8	142.0 $\pm$ 16.1 <sup>b</sup>	180.2 $\pm$ 41.6 <sup>c</sup>
1e/M30C	6.77 $\pm$ 0.76	0.22 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	30.9 $\pm$ 2.2	99.6 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>	129.1 $\pm$ 7.7 <sup>c</sup>

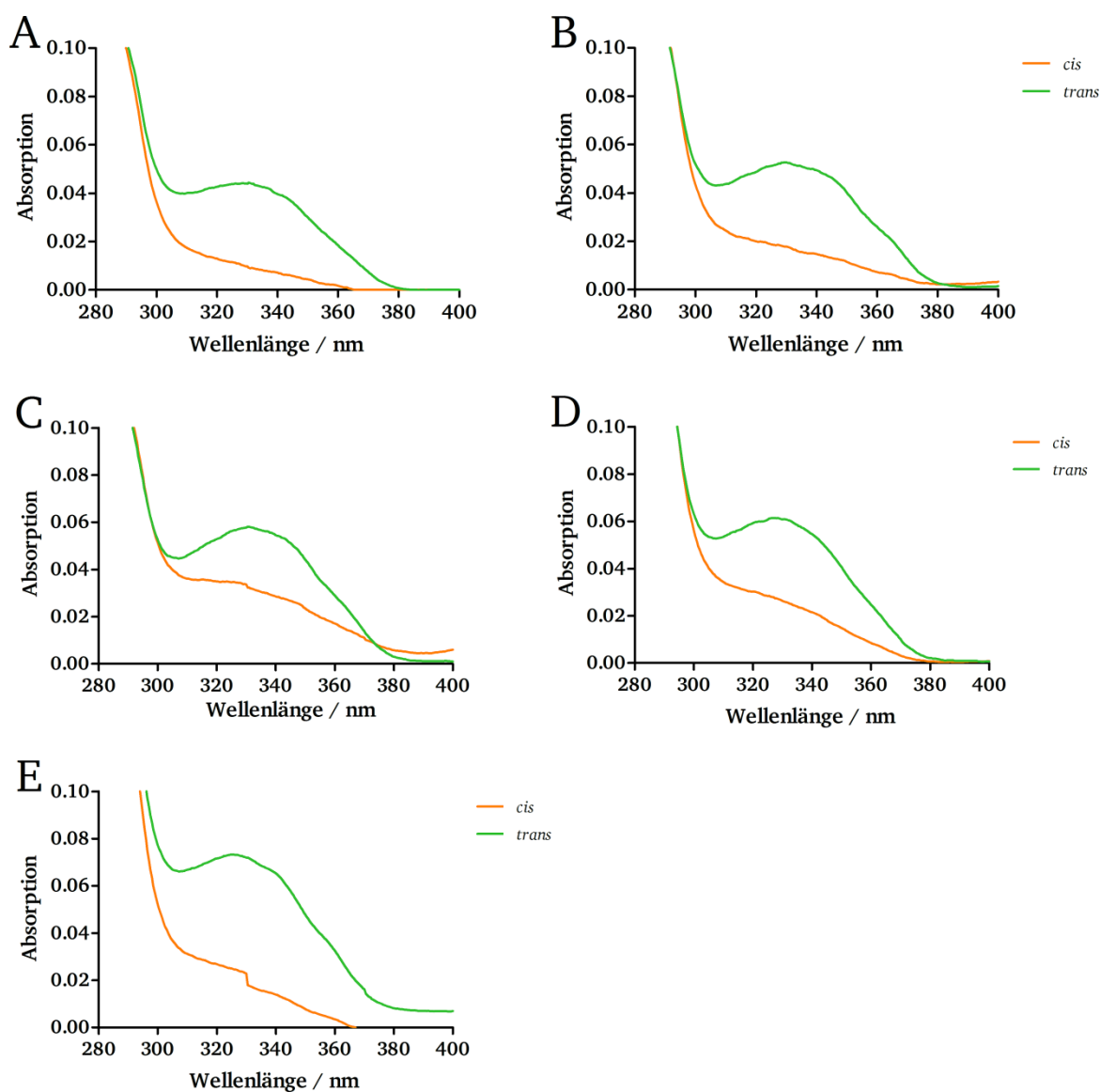
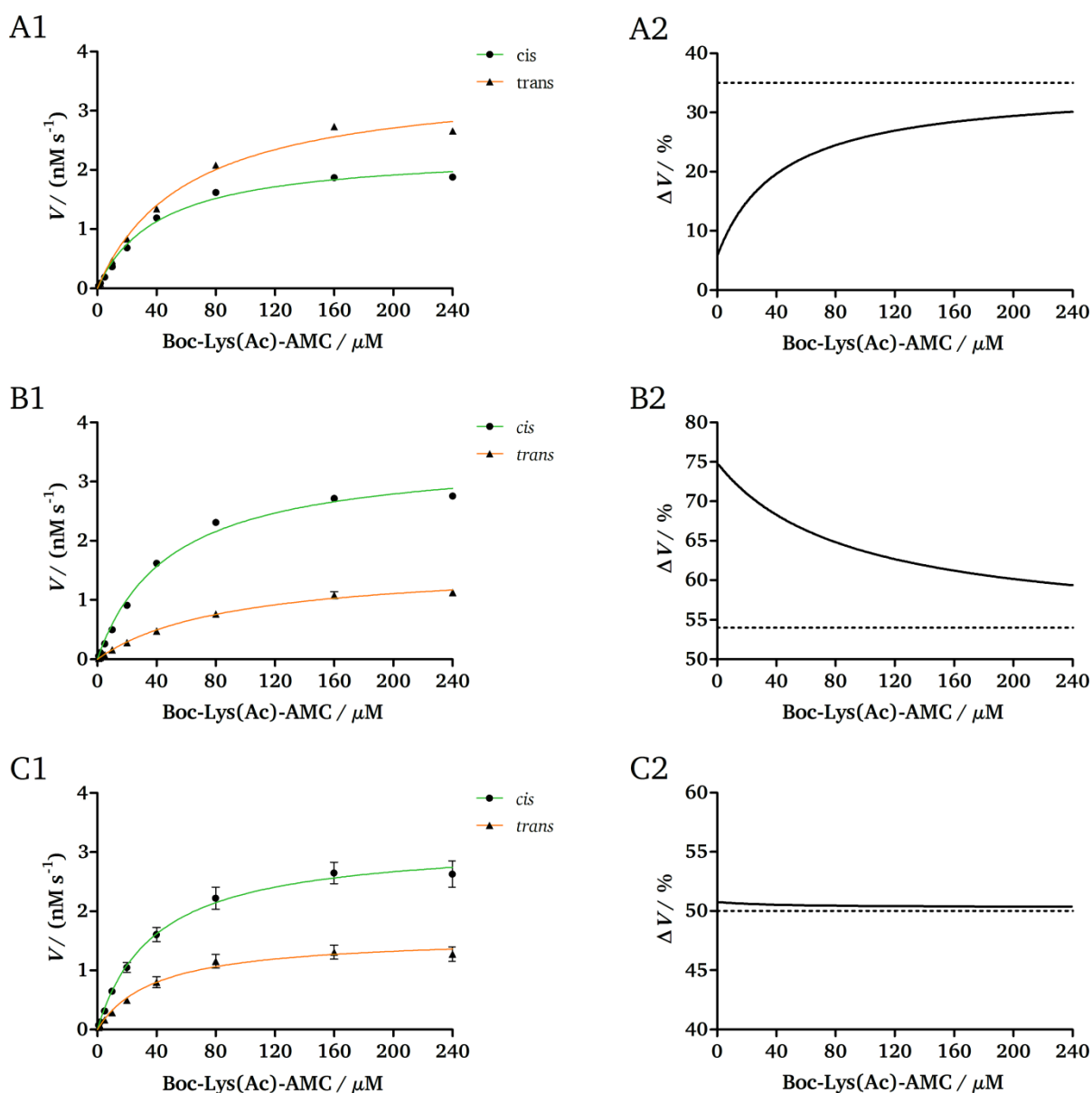


Abb. A. 13: UV/Vis-Spektren der *cis*- und *trans*-Konfiguration von AMD/HDAH-M30C-Konjugaten. Die Kopplung von AMD 1a (A), 1b (B), 1c (C), 1d (D) und 1e (E) an HDAH-M30C erfolgte wie für 4-PAM beschrieben (Kap. 3.2.10). 3  $\mu$ M des jeweiligen AMD/HDAH-M30C-Konjugats wurden in die *cis*- (UV-A) sowie *trans*-Konfiguration (Blaulicht) überführt (Kap. 3.2.8.1) und UV/Vis-Spektren in MK-Puffer bei 30°C aufgenommen (Kap. 3.2.15.1). Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>





**Abb. A. 14: Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM und AMD 1a-b/HDAH-M30C-Konjugaten.** (A1) Die 4-PAM sowie (B1) AMD 1a und (C1) AMD 1b/HDAH-M30C-Konjugate wurden in die *cis*- (UV-A) bzw. *trans*-Konfiguration (Blaulicht) überführt und Michaelis-Menten Kinetiken aufgenommen (Kap. 3.2.13.2). In **A2** (4-PAM), **B2** (AMD 1a) und **C2** (AMD 1b) wurden die relativen Geschwindigkeitsdifferenzen ( $\Delta V$ ) zwischen dem jeweils aktiveren und inaktiveren Azobenzol-Maleimid-Konjugat prozentual gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte der Michaelis-Menten Kinetiken entsprechen Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ . Die jeweils gestrichelten Linien geben die Photoschaltungeffizienzen wieder, welche nach Extrapolierung der Michaelis-Menten Kinetiken mittels dem Programm GraphPad Prism über  $V_{\max}$  ermittelt wurden (**A2** = 50 %, **B2** = 35 % und **C2** = 54 %). Im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>

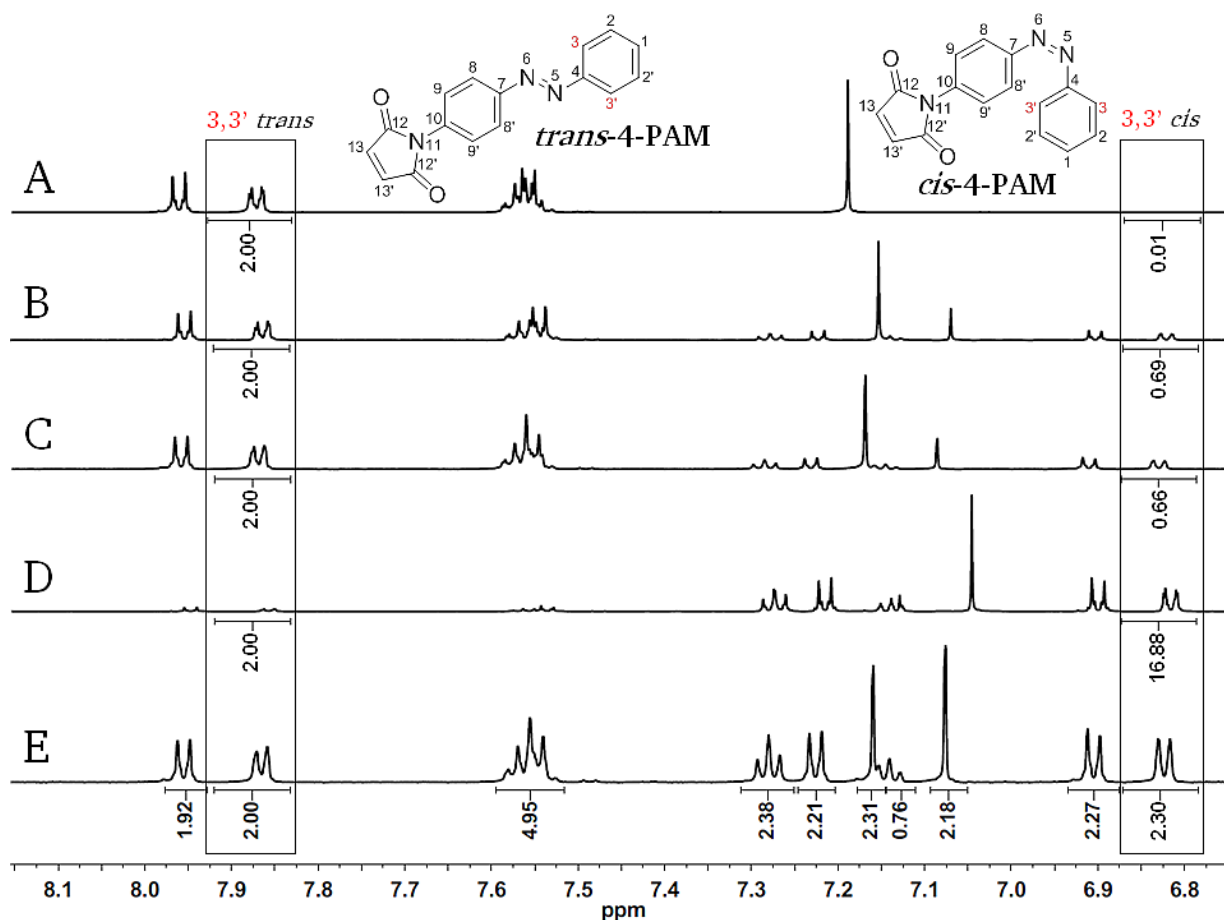
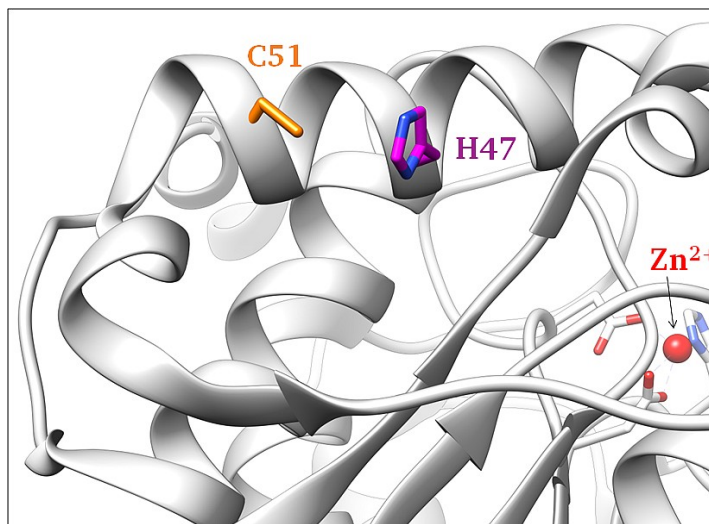
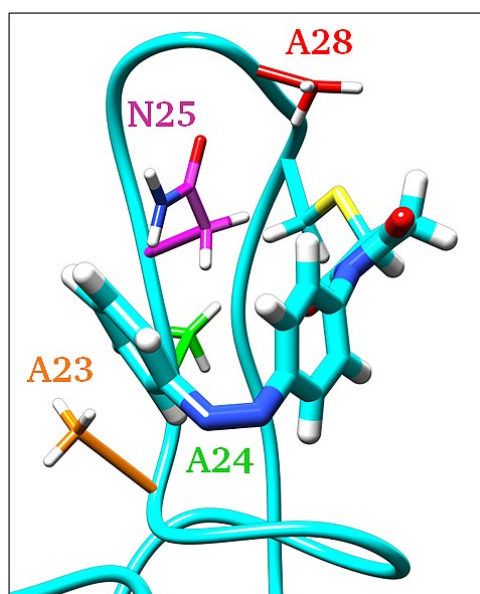


Abb. A. 15: 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von 4-PAM in  $\text{DMSO-d}_6$ . 5 mM 4-PAM/ $\text{DMSO-d}_6$  Lösungen wurden unterschiedlich behandelt. (A) 80 °C, 1 h, (B) 60 min Blaulicht, (C) 25 min Blaulicht, (D) 60 min UV-A und (E) 25 min UV-A. Für die Quantifizierung der PSS wurden die  $^1\text{H}$ -NMR Signale von den Protonen  $\text{H}_3$  bzw.  $\text{H}_{3'}$  der *cis*- (6.921 - 6.834 ppm) und *trans*-Konfiguration (7.970 - 7.882 ppm) integriert und der *cis*- bzw. *trans*-Anteil prozentual berechnet. Das Integral des *trans*-Isomers wurde auf 2.000 normiert. Exemplarisch wurden für alle in (E) dargestellten Protonen Signale die Integrale angegeben. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden wie in Kap. 3.2.18 beschrieben aufgenommen. Modifiziert nach Horstmann *et al.*<sup>17</sup>



**Abb. A. 16: Potentiell involviertes Histidin in der Stabilisierung von *cis*-4-PAM an der HDAH-Wt-Oberfläche.** Zur räumlichen Orientierung wurde das Aktivzentrum aufgezeigt. Das katalytische Zink-Ion ( $\text{Zn}^{2+}$ , rote Kugel) wird durch ein Histidin (H182) und zwei Aspartatreste (D180 und D268) koordinativ gebunden. C51 (orange) stellt die 4-PAM-Modifikationsstelle dar, in dessen Nachbarschaft das H47 (magenta) an einer Stabilisierung von *cis*-4-PAM beteiligt sein könnte.



**Abb. A. 17: HC-ähnliche Struktur zur potentiellen Stabilisierung von *cis*-4-PAM an der HDAH-M30C-Oberfläche.** Gezeigt ist ein Bildausschnitt aus der MD-Simulation des *cis*-4-PAM/HDAH-M30C-Konjugats nach 19 ns. Für drei Alanine (A23, A24 und A28) wurden C-C Kontakte mit *cis*-4-PAM prognostiziert, die im Vergleich zu dem *cis*-4-PAM/HDAH-S20C-Konjugat eine HC-ähnliche Struktur ausbilden und hydrophobe Interaktionen vermitteln könnten. Eine Wasserstoffbrückenbindung wurde zwischen N25 (magenta) und der Maleimidgruppe von 4-PAM vorhergesagt.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

$\theta_{\text{mrw}}$	mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest
°C	Grad Celcius
4-PAM	4-Phenylazomaleinanil
A	Alanin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Abb. A	Abbildung im Anhang
ad.	auffüllen auf
AMBER	<i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i>
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AMD	Azobenzolalkyl-Maleimid-Derivat
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAH	Acetylpolyamin Amidohydrolase
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AZO	Azobenzolderivat
AzoPhe	Phenylazophenylalanin
BCA	Bicinchoninsäure-
beob.	beobachtet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bspw.	beispielsweise
C	Cystein
CAP	<i>catabolite activator protein</i>
CASTp	<i>computed atlas of surface topography of proteins</i>
CD	Circulardichroismus
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
D	Aspartat
D1	Relaxationszeit (NMR)
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array Detektor

DC	<i>Direct current</i>
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DE3	T7 RNA-Polymerase des $\alpha$ -Prophagen
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacrylamid
DMAA	<i>N</i> -4-Phenylazophenylacrylamid
DMAAm	<i>N</i> -4-Phenylazophenylacrylamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOL	Molare Kopplungsverhältnis
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Endoglukanase
EG	Endoglukanase
EP1/2	Elutionspuffer 1 oder 2
EP2-G	Elutionspuffer 2-Gradient
ESI	Elektrospray-Ionisation
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
F. Vol.	Fraktionsvolumen
FP	<i>Forward</i> -Primer
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
HC	Hydrophober Cluster
HDACs	Histondeacetylasen
HDAH	Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase
HDLP	Histondeacetylase-ähnliches Protein
His <sub>6</sub> -Tag	Hexa-Histidin-Tag
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
h $\nu$	Energie eines Photons
I. Vol.	Injektionsvolumen
iGluR	ionotropen Glutamatrezeptor
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>k</i>	Unimolekulare /einphasige Ratenkonstante (thermische Relaxation)

K	Kelvin
kb	Kilobase
Kap.	Kapitel
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
$k_{\text{fast}}$	Schnelle bimolekulare /zweiphasige Ratenkonstante (thermische Relaxation)
$k_{\text{slow}}$	Langsame bimolekulare /zweiphasige Ratenkonstante (thermische Relaxation)
L	Leucin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBD	Liganden-Bindedomäne
LC	Flüssigkeitschromatographie
LCST	untere kritische Lösungstemperatur
LED	Leuchtdiode
$m/z$	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MAG	Maleimid-Azobenzol-Glutamat
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MD	Molekulardynamik
mdeg	Milligrad
MKA-Puffer	Maleimid-Kopplung-Aktivitätspuffer
MK-Puffer	Maleimid-Kopplungspuffer
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
ns	Nanosekunde
NAA	<i>cis</i> -(1S,4R)-N-[4-(hydroxymethyl)cyclopent-2-enyl]acetamid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPT	Isotherm-isobar Ensemble
NS	<i>Number of scans</i>
NTD	N-terminale Domäne
NVT	Kanonisches Ensemble

---

OD	Optische Dichte
P	Prolin
PA	Polyacrylamid
ps	Pikosekunde
PAL	<i>photoswitchable affinity label</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB ID	Proteindatenbank-Identifikationscode
PEG-M	Polyethylenglycol-Maleimid
PME	<i>Particle-Mesh-Ewald</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PSS	Photostationärer Zustand
PTL	<i>photoswitchable tethered ligand</i>
P-Typ	Photochemisch reversibel
RFU	Relative Fluoreszenzintensität
RIL	Arginin-Isoleucin-Leucin
RMSD	<i>Root-mean-square-deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reverse-Primer</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAHA	Suberoylanilid Hydroxamsäure
SASA	<i>solvent accessible surface area</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tab. A.	Tabelle im Anhang
TBI	Triple-Resonanz Breitband
TEMED	Tetramethylethyldiamin

---

---

theor.	theoretisch
$T_m$	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
$t_R$	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
T-Typ	Thermisch reversibel
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	verglichen
VIS	Visuell
VMD	<i>visual molecular dynamics</i>
vs.	versus
Wt	Wildtyp
WW	Wechselwirkungen
YASARA	<i>Yet Another Scientific Artificial Reality Application</i>
$\Delta$	Temperaturänderung
$\Delta\mu$	Dipolmomentänderung
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
$\theta$	Elliptizität
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
$\lambda_{max}$	Absorptionsmaximum
$\lambda$	Wellenlänge

---



## 10. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Verallgemeinerte Darstellung der Photochromie .....	2
<b>Abb. 2:</b> Reversible Photoisomerisierung von <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Azobenzol .....	7
<b>Abb. 3:</b> Angenommene <i>trans</i> -zu- <i>cis</i> Photoisomerisierungsmechanismen von Azobenzol.....	8
<b>Abb. 4:</b> Übersicht über Biomoleküle (orange umrahmt) und biologische Prozesse (blau umrahmt), welche durch Modifikation mit Azobenzolderivaten photoreguliert werden können .....	9
<b>Abb. 5:</b> Proteinmodifikationsreaktionen an Lysin (A) und Cystein (B), vermittelt durch verschiedene Amin- und thiolreaktive Reagenzien.....	11
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der reversiblen <i>cis/trans</i> Photoisomerisierung von 4-PAM.....	12
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung zur Photokontrolle von iGluR6 mittels einer PTL-Verbindung (MAG) .....	13
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung zur reversiblen Photokontrolle der EG 12A Aktivität durch das photo- und temperaturresponsive DMAA-Copolymer .....	15
<b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung der reversiblen Konformationsänderung einer $\alpha$ -Helix durch <i>cis/trans</i> Photoisomerisierung eines Azobenzolderivats.....	16
<b>Abb. 10:</b> Reversible Photokontrolle der Endonukleaseaktivität einer scPvuII-Variante durch <i>cis/trans</i> Photoisomerisierung eines Azobenzolderivats.....	17
<b>Abb. 11:</b> Reversible <i>cis/trans</i> Isomerisierung der photoschaltbaren, unnatürlichen Aminosäure Phenylazophenylalanin (AzoPhe) .....	18
<b>Abb. 12:</b> Kristallstruktur von FB188 HDAH (A) und Darstellung der Oberfläche (B).....	19
<b>Abb. 13:</b> Allgemein vorgeschlagener Katalysemechanismus für Zink-abhängige HDACs und HDAC- ähnlichen Enzymen .....	20
<b>Abb. 14:</b> Substrate von HDAH.....	21
<b>Abb. 15:</b> Schematische Darstellung für die potentiell reversible Photokontrolle der HDAH-Aktivität durch 4-PAM .....	22
<b>Abb. 16:</b> Zweistufiges Testprinzip des HDAH-Aktivitätstest .....	56

<b>Abb. 17:</b> Bestrahlungszeitabhängige Photoisomerisierung von 4-PAM in DMSO.....	67
<b>Abb. 18:</b> Kalkulierte SASA-Werte für HDAH-Cysteine.....	71
<b>Abb. 19:</b> 4-PAM Modifikation von HDAH-Wt.....	73
<b>Abb. 20:</b> LC-ESI-MS Analyse des Trypsin-hydrolysierten 4-PAM/HDAH-Wt-Konjugats.....	76
<b>Abb. 21:</b> PEG-M-Modifikation von HDAH-Wt und HDAH-Variante C51S .....	77
<b>Abb. 22:</b> Generierte Cystein-HDAH-Varianten .....	79
<b>Abb. 23:</b> <i>cis/trans</i> -Photoisomerisierung von 4-PAM gekoppelten HDAH-Varianten. ....	82
<b>Abb. 24:</b> Bestimmung des Blaulicht-induzierten <i>trans</i> -4-PAM-Anteils .....	83
<b>Abb. 25:</b> Einfluss der UV-A und Blaulichtbestrahlungszeit auf die Photoschaltungseffizienz der 4-PAM/HDAH M30C und S20C Konjugate.....	87
<b>Abb. 26:</b> Multiple <i>cis/trans</i> -Photoisomerisierung von gekoppeltem 4-PAM an den HDAH-Varianten M30C und S20C .....	89
<b>Abb. 27:</b> Reversible Photoschaltung der 4-PAM/HDAH-M30C-Konjugat Aktivität.....	91
<b>Abb. 28:</b> Thermische <i>cis</i> -zu- <i>trans</i> Relaxationskinetiken von 4-PAM sowie in konjugierter Form an HDAH-Wt, HDAH-Variante S20C und M30C.....	93
<b>Abb. 29:</b> MD-Simulationen der 4-PAM/HDAH-Konjugate M30C (A1) and S20C (B1) in <i>cis</i> - (türkis, <i>cis</i> -4-PAM) und in <i>trans</i> -Konfiguration (orange, <i>trans</i> -4-PAM) nach einer Simulationszeit von 19 ns .....	97
<b>Abb. 30:</b> CD-Spektren von unmodifizierten sowie 4-PAM-modifizierten HDAH Konjugaten.....	99
<b>Abb. 31:</b> MD-Simulation vorhergesagter Aminosäuren für die HDAH-Variante S20C, die an intermolekularen Interaktionen mit dem angekoppelten 4-PAM-Rest in <i>cis</i> - und in <i>trans</i> -Konfiguration beteiligt sind .....	101
<b>Abb. 32:</b> Thermische <i>cis</i> -zu- <i>trans</i> Relaxationskinetiken von 4-PAM/HDAH-S20C, H35S und H35D Konjugaten.....	110
<b>Abb. 33:</b> Schematisch Darstellung der AMD-Modifikation von HDAH-M30C .....	111
<b>Abb. 34:</b> Alkylspacer und <i>cis/trans</i> -konfigurationsabhängiger Einfluss auf die Michaelis-Menten Parameter des AMD/HDAH-M30C-Konjugats .....	113

<b>Abb. 35:</b> Postulierter Photoschaltungsmechanismus von <i>cis</i> -4-PAM an der Proteinoberfläche von HDAH-S20C .....	127
<b>Abb. 36:</b> Postulierter Photoschaltungsmechanismus von <i>trans</i> -4-PAM an der Proteinoberfläche von HDAH-S20C. ....	128
<b>Abb. A. 1:</b> Applizierte UV-A und Blaulicht Bestrahlungsdosen. ....	146
<b>Abb. A. 2:</b> AMC-Kalibriergerade. ....	147
<b>Abb. A. 3:</b> Isosbestischer Punkt von 4-PAM .....	147
<b>Abb. A. 4:</b> RMSD-Werte von 4-PAM/HDAH-S20C und M30C .....	148
<b>Abb. A. 5:</b> VMD spezifische Annotation der C-Atome von 4-PAM und von den wichtigsten Aminosäuren.....	149
<b>Abb. A. 6:</b> Protonenannotation der 4-PAM-Isomere.....	151
<b>Abb. A. 7:</b> IMAC-Chromatogramm von HDAH-Variante H35S an immobilisierten $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen .....	152
<b>Abb. A. 8:</b> LC-ESI-MS Analyse von Trypsin-hydrolysierten HDAH-Wt-Konjugat .....	153
<b>Abb. A. 9:</b> SDS-PAGE verschiedener exprimierter Cystein-HDAH-Varianten. ....	154
<b>Abb. A. 10:</b> Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM/HDAH-Variant-Konjugaten.....	155
<b>Abb. A. 11:</b> Dosis-Wirkungskurven von 4-PAM und AMDs.....	160
<b>Abb. A. 12:</b> Dosis-Wirkungskurve von SAHA.....	161
<b>Abb. A. 13:</b> UV/Vis-Spektren der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Konfiguration von AMD/HDAH-M30C-Konjugaten..	162
<b>Abb. A. 14:</b> Michaelis-Menten Kinetiken von 4-PAM und AMD 1a-b/HDAH-M30C-Konjugaten .....	163
<b>Abb. A. 15:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von 4-PAM in $\text{DMSO-d}_6$ .....	164
<b>Abb. A. 16:</b> Potentiell involviertes Histidin in der Stabilisierung von <i>cis</i> -4-PAM an der HDAH-Wt-Oberfläche.....	165
<b>Abb. A. 17:</b> HC-ähnliche Struktur zur potentiellen Stabilisierung von <i>cis</i> -4-PAM an der HDAH-M30C-Oberfläche.....	165

## 11. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Potentielle photoschaltbare Verbindungen zur Regulierung von Biomolekülfunktionen .....	4
<b>Tab. 2:</b> Mutagenese-Primer zur Entwicklung photoschaltbarer HDAH-Varianten .....	36
<b>Tab. 3:</b> Mutagenese-Primer zur Untersuchung der <i>cis</i> -4-PAM Konfigurationsstabilisierung sowie des Photoschaltungsmechanismus an der HDAH-S20C-Proteinoberfläche .....	37
<b>Tab. 4:</b> Primer zur Restriktionsschnittstellenerweiterung von <i>Nde</i> I und <i>Eco</i> RI.....	37
<b>Tab. 5:</b> Sequenzierungsprimer .....	38
<b>Tab. 6:</b> PCR-Reaktionsansatz für die ortsspezifische Mutagenese.....	42
<b>Tab. 7:</b> PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese .....	43
<b>Tab. 8:</b> IMAC-Programm zur Aufreinigung von HDAH-Varianten. ....	49
<b>Tab. 9:</b> Ansatz zur Herstellung von diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen .....	52
<b>Tab. 10:</b> PSS von 4-PAM .....	69
<b>Tab. 11:</b> $\epsilon$ von <i>trans</i> -4-PAM.....	72
<b>Tab. 12:</b> Prognostizierte Peptidmassen von 4-PAM modifizierten Cystein-Fragmenten, basierend auf der Simulation eines tryptischen Verdaus. ....	75
<b>Tab. 13:</b> DOL-Werte von 4-PAM modifizierten HDAH-Varianten .....	80
<b>Tab. 14:</b> $V_{\max}$ and $K_m$ Werte von 4-PAM modifizierten und unmodifizierten HDAH-Varianten.....	85
<b>Tab. 15:</b> Ratenkonstanten and relative Amplituden thermischer <i>cis</i> -zu- <i>trans</i> Relaxationskinetiken von ungebundenem 4-PAM und in konjugierter Form an HDAH-Wt, S20C und M30C.....	94
<b>Tab. 16:</b> Aminosäuresubstitution von HDAH-S20C selektierten Aminosäuren durch ortsspezifische Mutagenese.....	102
<b>Tab. 17:</b> $V_{\max}$ and $K_m$ Werte von 4-PAM-modifizierten und unmodifizierten HDAH-S20C-Varianten .	104
<b>Tab. 18:</b> Einfluss von Aminosäuresubstitutionen auf kinetische Parameter der thermischen <i>cis</i> -zu- <i>trans</i> Relaxation von 4-PAM/HDAH-S20C-Variant-Konjugaten .....	108
<b>Tab. 19:</b> DOL-Werte der AMD-modifizierten HDAH-Variante M30C .....	112
<b>Tab. 20:</b> $IC_{50}$ -Werte der <i>cis/trans</i> -Isomere von 4-PAM und AMDs .....	114

---

<b>Tab. A. 1:</b> Prognostizierte Peptidfragmente von HDAH-Wt nach tryptischen Verdau.....	150
<b>Tab. A. 2:</b> Zuordnung und chemische Verschiebung von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -4-PAM in DMSO-d <sub>6</sub> .....	151
<b>Tab. A. 3:</b> MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 Å) zwischen <i>cis</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-M30C .....	156
<b>Tab. A. 4:</b> MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (4.4 und 3.8 Å) zwischen <i>cis</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C .....	157
<b>Tab. A. 5:</b> MD-Simulation prognostizierte C-C Kontakte (3.8 Å) zwischen <i>trans</i> -4-PAM und Aminosäuren von HDAH-S20C .....	158
<b>Tab. A. 6:</b> $V_{\max}$ und $K_m$ -Werte unmodifizierter und AMD-modifizierter HDAH-M30C. ....	161

---

## 12. Publikationen

Korbus, M., Backé, S., & Meyer-Almes, F.-J. (2015). The cis-state of an azobenzene photoswitch is stabilized through specific interactions with a protein surface. *J. Mol. Recognit.* **28**, 201-209

Horstmann, B., Korbus, M., Friedmann, T., Wolff, C., Thiele, C. & Meyer-Almes, F.-J. (2014). Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase. *Bioorg. Chem.* **57**, 155-161

Korbus, M., Balasubramanian, G., Müller-Plathe, F., Kolmar, H. & Meyer-Almes, F.-J. (2014). Azobenzene switch with a long-lived cis-state to photocontrol the enzyme activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase. *Biol. Chem.* **395**, 401-412

Haus, P., Korbus, M., Schröder, M., & Meyer-Almes, F.-J. (2011). Identification of selective class II histone deacetylase inhibitors using a novel dual-parameter binding assay based on fluorescence anisotropy and lifetime. *J. Biomol. Screen.* **16**, 1206-1216

### Posterbeiträge:

„Highly retarded thermal cis-to-trans relaxation of an azobenzene-based photoswitch enables photocontrol of the enzyme activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase from *Bordetella/Alcaligenes* strain *FB188* by a single light pulse" - Molecular Life Sciences 2013, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main (03. - 06. Oktober 2013)

„Photoisomerization of a monofunctional azobenzene derivative reversibly regulates the enzyme activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase from *Bordetella/Alcaligenes* strain *FB188*" - Soft Control - Switching surface properties with stimuli responsive soft matter, International Conference, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt (22. - 24. September 2013)

„Photocontrol of the enzymatic activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase (HDAH)" 9th Horizons in Molecular Biology – International PhD Student Symposium, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen (08. - 11. Oktober 2012)

„Photocontrol of the enzymatic activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase (HDAH)" - Materials Science Engineering (MSE 2012), Biennial International Conference, Darmstadt (25. - 27. September 2012)

### 13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes bedanken für die Bereitstellung des interessanten Themas, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich ihm für die Unterstützung in allen Belangen, die freie wissenschaftliche Entfaltung und für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar bedanken für die Übernahme des Referats und die stets offen stehende Tür in wissenschaftlichen Angelegenheiten und Diskussionen.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Florian Müller-Plathe und Herrn Dr. Ganesh Balasubramanian für die Unterstützung und Durchführung bei den Molekulardynamik-Simulationen und gleichermaßen bei Frau Prof. Dr. Christina Marie Thiele und Christiane Wolff bei der Unterstützung und Durchführung von NMR-Messungen bedanken. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Plenio und Pavlo Kos dafür, den DAD-UV/Vis-Spektrophotometer jederzeit nutzen zu dürfen und Sebastian Hörner für die Hilfe bei der Durchführung von LC-ESI-MS Experimenten.

Darüber hinaus möchte ich mich sehr bei Frau Janina Fengel und Herrn Prof. Dr. Arnd Steinmetz (Hochschule Darmstadt) für ein sechsmonatiges Promotionsstipendium bedanken und der damit ausgedrückten Unterstützung meiner Promotion.

Ich möchte mich im Allgemeinen bei der AG Meyer-Almes und der AG von Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer für das tolle Arbeitsklima und besonders bei Stephan Zindel, Michael Schröder, Ulrike Becher, Jan Brod, Christian Meyners, Benjamin Horstmann, Alexander Kleinschek und Andreas Krämer für die schöne Zeit im Labor und bei privaten Ausflügen bedanken. Ein großer Dank gilt ebenso Sarah Backé und Tatjana Friedmann für die tolle Zusammenarbeit und die Begeisterung für die Forschung.

Mein ganz besonderer Dank gebührt schlussendlich meiner Frau Anne-Marie und meiner Familie! Ich danke euch von Herzen für eure kompromisslose Unterstützung während der Promotion und dass ihr stets an mich geglaubt habt. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen!

## 14. Erklärungen

Michael Korbus  
Starksäckerweg 25  
69502 Hemsbach

09. Februar 2015

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

(Unterschrift)



Michael Korbus  
Starksäckerweg 25  
69502 Hemsbach

09. Februar 2015

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

(Unterschrift)

---

## 15. Lebenslauf

**Name:** Michael Korbus

**Geburtsdatum:** 06. Februar 1986

**Geburtsort:** Heppenheim

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:** verheiratet

**2011 - 2015** **Promotion** an der Hochschule Darmstadt (h\_Da) in Kooperation mit der Technischen Universität Darmstadt (TUD) bei Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes (h\_Da, Fachbereich Chemie- und Biotechnologie) und Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar (TUD, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie).

**Dissertation:** „Entwicklung und Charakterisierung einer photoschaltbaren Histondeacetylase-ähnlichen Amidohydrolase“.

**2006 - 2010** **Biotechnologiestudium:** Hochschule Darmstadt, Fachbereich Chemie- und Biotechnologie. Abschluss: **Dipl.-Ing. (FH)**

**Diplomarbeit:** „Charakterisierung des Pyruvatdehydrogenasekomplex *in vitro* und *in vivo*“. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, *R&D Biologics / Nucleic Acid Therapeutics*, Frankfurt am Main

**2005 - 2006** **Praktikum als technischer Assistent der Biotechnologie:** Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim

**2004 - 2005** **Zivildienst:** Kreisaltenheim Schriesheim

**2002 - 2004** **Fachhochschulreife und Ausbildung als staatlich geprüfter technischer Assistent der Biotechnologie:** Johannes-Gutenberg-Schule Heidelberg

---

(Unterschrift)

---